



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

의학박사 학위논문

차세대염기서열분석 기법을 이용한
한국인의 미토콘드리아
전체염기서열분석

Entire Mitochondrial DNA Sequencing
on Massively Parallel Sequencing
for the Korean population

2017년 8월

서울대학교 대학원

의학과 법의학 전공

박소형

초 록

미토콘드리아의 디옥시리보핵산(DNA) 염기서열분석은 유전적 다양성을 파악할 수 있는 중요한 분석도구로, 인류의 기원을 알기 위한 계통발생학 분야에서 뿐만 아니라 그 유전적 다양성을 바탕으로 하는 법의학의 개체식별 영역에서도 유용한 방법으로 사용되어 왔다. 종래의 미토콘드리아 DNA 염기서열분석기법은 실무적인 측면에서 비용 및 시간적인 효율성 때문에 조절부위(the control region) 등 일부 염기서열에 국한하여 시행되어 왔었고, 따라서 그에 따른 유전적 다양성에 대한 정보도 제한적일 수밖에 없었다. 인간유전체사업 이후 방대한 유전학적 정보를 효율적으로 분석할 수 있는 새로운 기술의 필요성이 대두되면서 차세대염기서열분석기법이 개발되었다. 이러한 유전학의 기술적 발전은 적은 비용과 시간으로도 미토콘드리아의 전체 염기서열분석이 가능하게 되어, 기존의 방법으로는 제한적이었던 유전적 특성에 대해서도 손쉽게 접근할 수 있게 되었다. 그리하여 여러 인종에서 나타나는 미토콘드리아 DNA의 유전적 다양성에 대한 새로운 정보를 알아내고자 하는 연구들이 시도되기 시작하였다. 또한 법의학 개인식별 측면에서도 더 많은 추가적인 정보를 통해 개인식별력을 높일 수 있을 것으로 기대되었다. 한국인의 경우 기존의 대부분의 분석 자료들은 주로 조절부위, 암호부위 일부 등에 국한된 것이었으며 그에 따른 유전적 다양성에 대한 정보도 제한적인 상황이다. 따라서 이러한 연구변화의 흐름에 따라 한국인의 미토콘드리아 DNA 전체염기서열분석 및 그에 따른 유전적 다양성에 대한 연구가 필요하다고 보았다. 따라서 본 연구를 통해 한국인의 미토콘드리아 DNA 전체염기서열을 분석하여 한국인에서 나타나는 유전적 특성을 파악하고 이를 바탕으로 한국인에서 법의학적으로 개인식별력을 높일 수 있는지 알아보하고자 하였다. 한국인에서 주로 나타나는 하플로그룹(haplogroup, 조절부위 근거)의 빈도를 고려하여 186명의 한국인 시료를 선별하여 차세대 염기서열분석기법인 Ion Torrent Personal Genome Machine (PGM) 기술(Thermo-Fisher사)을 적용하여 미토콘드리아 DNA 전체 염기서열분석을 시행하였다. 분석결과 중국 등 동아시아 민족과 다른 대륙의 민족과 비교하여 보았을 때, 한국인에서 나타나는 각 조절부위 및 암호부위별 변이의 구성과 분포, 이형세포질성의 분포 등은 전반적으로 다른 민족과 유사하였으나, 각 민족에서 공통적으로

나타나는 주요 변이와 위치는 중국과 일본 등 동아시아 민족 안에서는 거의 유사하지만 다른 민족에서는 다르게 나타났다. 전체염기서열분석에 따른 하플로그룹의 유형과 세분화, 하플로타입(haplotype)에 대한 분석 결과, 조절부위에 근거하였을 때의 하플로그룹 분류보다 전체염기서열분석결과 세분화되는 양상을 보여주었으며, 조절부위로 결정되었던 하플로그룹이 전체염기서열분석결과 다른 하플로그룹으로 재분류되었다. 이는 중국 등 동아시아 민족과 다른 대륙의 민족에서도 유사한 양상을 보였고, 특히 한국인을 포함하는 동아시아 인종의 경우 매크로하플로그룹 (macrohaplogroup) M(D, G, M)이 주요 하플로그룹을 이룬다는 점에서, 전체염기서열분석 정보는 유전적 다양성을 파악하는데 필수적이며, 조절부위 등에 국한된 정보는 유전적 다양성을 파악하는데 제한적임을 알 수 있었다. 이와 함께 한국인에서는 개체수에 비해 하플로그룹 개수가 낮은 편이지만 하플로타입의 개수는 개체수에 근접한 점 역시 전체염기서열분석이 개체식별력을 높여줄 수 있음을 보여주는 것이었다. 이와 함께 동일한 하플로그룹 안에서 서로 다른 변이 즉 개별변이(private mutation)의 발견 등은 한국인에서 잠재적인 새로운 하위 하플로그룹의 가능성을 고려해 볼 수 있는 소견으로 생각되었다. 한국인의 미토콘드리아 DNA에서도 이형세포질성이 관찰되었으며 그 분포와 양상은 다른 민족에서의 연구결과와 유사하였다. 본 연구가 앞으로 한국인에서 미토콘드리아 DNA의 유전적 다양성 및 질병연구에 대한 연구에 견인차 역할을 할 것으로 기대된다.

주요어 : 법의학, 미토콘드리아, mtDNA, 차세대염기서열분석, 한국인
학 번 : 2012-30549

목 차

서론	1
1. 미토콘드리아 DNA	1
1.1 미토콘드리아의 기원	1
1.1.1. 미토콘드리아의 신원	1
1.1.2. 미토콘드리아의 유래	1
1.1.3. 미토콘드리아의 역사	2
1.2 미토콘드리아의 유전 시스템	5
1.2.1. 미토콘드리아의 생장과 미토콘드리아 DNA	5
1.2.2. 미토콘드리아 DNA 복제	5
1.2.3. 미토콘드리아 DNA 변화	6
1.2.4. 미토콘드리아 DNA 복구시스템	7
1.2.5. 미토콘드리아 DNA 변화와 복구시스템 간의 불균형 및 유전시스템에 미치는 영향	7
1.3 미토콘드리아 DNA의 유전적 특성	8
1.3.1. 미토콘드리아 DNA 유전방식: 모계유전	8
1.3.2. 미토콘드리아 DNA 유전과 이형세포질성	10
1.4 미토콘드리아 DNA의 구조	13
1.4.1. 미토콘드리아 내 DNA의 구조	13
1.4.2. 미토콘드리아 DNA 가닥의 구조와 구성	14
1.4.3. 세포핵 미토콘드리아 DNA 염기서열(numt)	15
2. 법의학에서 미토콘드리아 DNA의 의의	16
2.1 법의학에서 활용되는 미토콘드리아 DNA의 특성	16
2.1.1. 미토콘드리아 DNA와 세포핵 DNA	16
2.1.2. 미토콘드리아 DNA 분석의 장점	17
2.1.3. 개체식별 측면에서 미토콘드리아 DNA의 특징	17
2.2 미토콘드리아 DNA와 계통발생학 및 법의학	18
2.2.1. 미토콘드리아 DNA와 인류의 진화 연구	18
2.2.2. 미토콘드리아 DNA로 인류 계통발생나무 구축	19
2.2.3. 미토콘드리아 DNA DB 구축	21
2.2.4. 미토콘드리아 DNA와 하플로그룹	23

2.3 미토콘드리아 DNA의 법의학적 활용의 역사	24
2.3.1. 미토콘드리아 DNA를 이용한 개인식별	24
2.3.2. 미토콘드리아 DNA 이형세포질성과 개인식별 ...	25
2.3.3. 한국에서 미토콘드리아 DNA와 개인식별	25
3. 법의학에서 미토콘드리아 DNA의 최근 연구동향	26
3.1 법의학에서 미토콘드리아 DNA에 대한 기존 연구의 한계	26
3.1.1. 미토콘드리아 DNA 분석의 한계	26
3.1.2. 기존 미토콘드리아 DNA 분석기법의 한계	26
3.2 차세대염기서열분석기법의 도입	27
3.2.1. 새로운 DNA 분석 기법의 필요성 대두	27
3.2.2. 생거기법의 기술적 변화: 피로시퀀싱	28
3.2.3. 차세대염기서열분석기법의 탄생	29
3.2.4. Ion Torrent PGM의 개발	30
3.3 법의학에서 차세대염기서열분석기법을 이용한 미토콘드리아 DNA 연구	31
3.3.1. 차세대염기서열분석기법을 적용한 미토콘드리아 DNA 염기서열분석기법의 입증	32
3.3.2. 다양한 인종에서 미토콘드리아 DNA 유전적 다양성 연구	32
3.3.3. 미토콘드리아 DNA 전체염기서열 분석도구의 변화 ...	33
3.4 동아시아 인종, 한국인에서 미토콘드리아 DNA에 대한 연구...	34
4. 연구의 필요성	36
목적	38
재료와 방법	39
1. 시료	39
2. 미토콘드리아 DNA 추출과 증폭	40
3. 라이브러리 준비와 초병렬염기서열분석	40

4. 자료분석	41
5. 윤리적 선언	41
 연구결과	 43
1. 미토콘드리아 DNA 염기서열분석과 coverage	43
1.1. 염기서열분석과 coverage	43
1.2. 염기서열부위에 따른 coverage	43
2. 미토콘드리아 DNA 염기서열에서 나타나 변이	43
2.1. 변이검출 및 불일치 해석	42
2.2. 보고되지 않은 변이 검출 오류	44
2.3. 삽입-결실과 관련된 정렬 오류	45
2.4. 기타 변이 검출	47
2.5. 동형세포질성 변이	47
2.6. 공통 변이	49
2.7. 개별 변이	49
3. 하플로그룹 분류	51
3.1. 하플로그룹 D	52
3.2. 하플로그룹 A5a	52
3.3. 하플로그룹 M7	53
3.4. 하플로그룹 F1b1	53
3.5. 하플로그룹 N9a2a	53
3.6. 하플로그룹 G1a1	54
3.7. 하플로그룹 Y1	54
3.8. 하플로그룹 B4	54
3.9. 하플로그룹 M9;G;D	55
4. 하플로타입	56
5. 점 이형세포질성	58
5.1. 점 이형세포질성의 정의	58
5.2. 점 이형세포질성에서 coverage	58
5.3. 점 이형세포질성의 분포와 양상	58
5.3.1. 하플로그룹 D4	59
5.3.2. 하플로그룹 A5a	60

5.3.3. 하플로그룹 M7	61
5.3.4. 하플로그룹 F1b1	61
5.3.5. 하플로그룹 G1a1	61
5.3.6. 하플로그룹 B4	62
5.3.7. 하플로그룹 N9a2a	62
5.3.8. 하플로그룹 M9;G;D	63
5.3.9. 하플로그룹 Y1	63
5.3.10. 동일개체에서 다수 이형세포질성 변이	64
5.3.11. 염기서열부위와 이형세포질성 변이	64
5.3.12. 하플로그룹을 결정하는 변이부위에 형성된 점이형세포 질성 변이	64
5.4. 세포핵 미토콘드리아 DNA 염기서열(numt)과 점 이형세포 질성	66
고찰	67
1. 차세대염기서열분석기법에 의한 미토콘드리아 DNA 전체염기 서열분석	67
1.1. 염기서열부위에 따른 coverage 변화	67
1.2. VCF의 변이검출 오류	67
2. 한국인에서 미토콘드리아 DNA 유전적 특성	68
2.1. 한국인에서 변이의 분포와 양상	68
2.2. 한국인에서 공통변이 양상	69
2.3. 한국인에서 하플로그룹의 세분화 양상	70
2.4. 한국인에서 하플로타입의 양상	72
2.5. 한국인에서 개별변이 양상	73
3. 한국인에서 미토콘드리아 DNA 점이형세포질성	74
4. 한국인에서 미토콘드리아 DNA 전체염기서열분석과 개체식별 력	75
결론	77
참고문헌	78

영문초록(Abstract)	91
표	94
그림	122
부록	131

표 목차

[표 1] 186명의 한국인에서 하플로그룹 분포구성	94
[표 2] 186명의 한국인의 인구학적 특성	95
[표 3] 미토콘드리아 DNA 전체염기서열 분석을 위한 길잡이	96
[표 4] 변이검출형식보고서에서 오검출된 변이	97
[표 5] IGV를 이용한 오검출된 변이 검토	98
[표 6] 미토콘드리아 DNA 동형세포질성 변이 분포	101
[표 7] 하플로그룹에 따른 개별변이 분포	102
[표 8] 한국인에서 하플로그룹 세분화 양상	103
[표 9] 하플로그룹을 결정하는 주요 변이	104
[표 10] 하플로타입의 양상	109
[표 11] 점 이형세포질성 변이 분석	110
[표 12] 점 이형세포질성 변이 분포	113
[표 13] 염기서열분석에서 coverage 비교	114
[표 14] VCF 변이검출오류 비교 분석	115
[표 15] 동형세포질성 변이의 민족간 비교분석	116
[표 16] 공통변이의 민족간 비교분석	117
[표 17] 하플로그룹 세분화 양상 민족간 비교분석	118
[표 18] 하플로그룹 재분류 비교 분석	120
[표 19] 점이형세포질성 비교분석	121

그림 목차

[그림 1] 미토콘드리아 DNA 구조	122
[그림 2] 미토콘드리아 DNA에 따른 인류의 이동과 분포 ...	123
[그림 3] 인류 계통발생나무	124
[그림 4] 한국인에서 주요 하플로그룹	125
[그림 5] 동아시아인에서 주요 하플로그룹	126
[그림 6] Ion Torrent PGM 기법	127
[그림 7] 한국인에서 하플로타입 양상 및 민족간 비교분석 ..	128
[그림 8] 전체염기서열분석결과 하플로그룹/하플로타입 변화	129
[그림 9] 전체염기서열분석결과 하플로타입 식별력 증가	130

서론

1. 미토콘드리아의 DNA

1.1. 미토콘드리아의 기원

1.1.1. 미토콘드리아의 신원

미토콘드리아는 세포의 세포질 안에 있는 작은 구조물을 말한다. 이 구조물은 이중막으로 둘러싸여 있는 구조이다. 주요 기능으로는 세포내 생명활동을 수행하기 위해 에너지가 필요하기 때문에 음식에서 소화과정을 통해 얻어진 포도당 등의 물질을 산화하여 ATP 등의 에너지를 생산하는 것이다. 이러한 기능적 특성 뿐만 아니라 미토콘드리아의 크기가 작은 세균과 크기가 유사하다는 점, 세포의 핵 DNA와는 별개로 독립적인 원형의 DNA 및 리보솜이 있는 점에 착안하여, 미토콘드리아는 세균에서 유래하였을 것이라는 가설을 제시하였다. 최초의 원시세포는 산소를 이용한 대사활동을 할 수 없었다. 그리하여 산소를 이용한 대사작용을 할 수 있어서 독립적으로 생존이 가능한 세균들을 포식하여 생존에 도움을 받으려 하였을 것이다. 또한 포식당한 세균들은 원시 세포 안에서 생존하려 하였을 것이기에 자기들을 포식한 원시세포와 공생하기로 하였을 것이다. 그 결과 세균들은 적대적인 외부 환경에서 보호받을 수 있는 안식처와 영양분을 공급받고, 대신 원시세포에게 에너지를 공급하여 생명활동을 유지할 수 있도록 하였을 것이다. (Alberts B et al., 2008, Scheffler IE., 2008)

1.1.2. 미토콘드리아의 유래

미토콘드리아 연구는 1800년대 후반에 들어서야 시작되었다. 이는 그 당시 탄생한 현미경과 조직 염색기술의 덕택으로 세포와 세포내 구조물을 직접 관찰함으로써 그들의 존재를 인지할 수 있었기 때문이기도 하였다. Altman은 1890년 ‘Elementarorganismen’ 이라는 책에서 세포질안에서 과립처럼 보이는 물질(오늘날의 미토콘드리아)을 ‘bioplast’ 라 명명하였고, “이들 과립과 같은 물질은 숙주 세포의 세포질에 생존하는 세균과 유사한 집락을 형성하면서

자율적이고 생존에 중요한 역할을 할 것이다” 라고 제시하였는데, 이는 현대의 미토콘드리아의 유래에 대한 가설과 매우 유사함을 알 수 있다. 1918년에 들어서, 우리가 미토콘드리아로 알고 있는 세포내 구조물에 대한 여러 연구들을 검토 후 종설이 발표되었는데 당시 미토콘드리아는 다양한 이름으로 설명되었다. “blepharoblasts, chondriokonts, chondriomites, chondrioplasts, chondriosomes, chondriospheres, fila, fuchsinophilic granules, Korner, Fadenkorper, mitogel, parabasal bodies, plasmasomes, plastochondria, plastosomes, vermicules, sarcosomes, interstitial bodies, bioblasts” 등으로 언급되었다. 이러한 여러 용어들 중 오늘날의 mitochondria (미토콘드리아)라는 용어로 정착된 것은 세포질에서 관찰되는 미토콘드리아의 모양을 묘사하던 데에서 유래하였다. 첫째 현미경으로 미토콘드리아를 직접 관찰하였을 때 과립처럼 보인다고 하여 그리스어인 Chondros, 영어의 grain, 독일어의 Korn 등을 이용하여 묘사하였었다. 둘째 염색기술 개발 덕분에 미토콘드리아를 더 상세하게 묘사할 수 있었던 점에서 유래하였다. 1800년대 후반에서부터 핵과 세포질, 세포내 구조물을 쉽게 구별하여 보여주는 염색기법을 고안하기 위해 부단히 노력하였고 그 결과 여러 가지 염색기법이 개발되었다. 염기성 염색시료와 산성 염색시료를 이용하면 조직학적으로 다른 색깔의 염색으로 세포와 조직구조물을 감별해 줄 수 있다는 발견을 바탕으로 1896년 오늘날 보편적으로 사용하는 헤마톡실린-에오신 염색 기법이 개발되었다. 세포구조물을 염색하여 구분하여 관찰할 수 있게 되면서, 일부 세포에서는 미토콘드리아가 실처럼 보이는 구조물로 관찰되었고, 이를 그리스어의 mitos로서 묘사하였다. 따라서 실을 뜻하는 mitos와 과립 또는 미립자를 뜻하는 Chondria가 합성되어 형성된 미토콘드리아, mitochondria’ 라는 용어가 탄생하였다. (Andrews RM, et al., 1999, Rosenthal CK, et al., 2009, Scheffler IE, 2008, Titford M, et al., 2005)

1.1.3. 미토콘드리아 연구의 역사

현미경과 조직 염색기술 덕분에 미토콘드리아가 명명되고 존재가 증명되었다면, 형광현미경과 생체염료 덕분에 미토콘드리아의 상세 구조가 밝혀졌다. 형광염료가 붙은 항체를 이용한 염색 처리를 하면 형광현미경을 통하여 미토콘드리아를 관찰할 수 있었다. 또한 로다민

유도체나 다른 친지질성 생체염료를 적용하면 살아있는 세포에서 미토콘드리아의 생활사를 관찰할 수 있었다. 그 원리로는 미토콘드리아막의 전위차를 이용하여 물질을 내강으로 운반되는 기전을 이용하여 미토콘드리아 안으로 염료를 농축시키는 것이다. 이를 저속으로 촬영하면 미토콘드리아의 역동적인 활동(크기와 모양의 변화), 세포질 안에서 미토콘드리아의 분포, 세포골격을 동요시켜 미토콘드리아를 재배치 등을 파악할 수 있었다. 이러한 기법을 통해 미토콘드리아의 특성들이 밝혀졌다. 간세포나 섬유모세포에서 관찰된 미토콘드리아는 소시지 모양으로 길이 3-4 μm , 지름 1 μm 미만으로 모양이나 크기는 작은 세균과 유사한 크기였다. 미토콘드리아의 수는 세포의 종류에 따라 수백개에서 수천개에 달할 만큼 달라질 수 있다. 예를 들면 인체의 난자는 100,000개 이상의 미토콘드리아가 있고, 정자에는 거의 없다. 또한 미토콘드리아의 성장과 분열은 각 세포의 분화와 기능에 따라 다르다는 점이 발견되었다. (Scheffler IE, 2008)

이러한 미토콘드리아의 구조에 대한 연구 뿐만 아니라 미토콘드리아의 기능에 대한 연구도 1900년대 전반부에 이루어졌다. 미토콘드리아는 호흡과 관련이 있고 세포내 에너지를 생산하는 역할을 담당하고 있음이 밝혀졌다. 근육조직에 대한 연구를 통해 미토콘드리아 안의 시토크롬, 철결합물, 플라빈과 피리딘 뉴클레오티드, 크렙스 회로 등에 대한 정보가 발견되었다. 이외에도 조직을 갈아서 얻어진 미토콘드리아에서 직접적으로 에너지 생산을 관장하는 효소들을 정제하여 연구해보려는 시도가 있었으나 세포들을 깨뜨린 부유액에 대한 완충제와 배지가 부적합하였기 때문에 좋은 성과는 얻지 못했다. 1940년대에 이르러서야 원심분리기를 이용하여 세포내 구조물을 분획할 수 있는 분석기법이 개발되어, 이를 통해 생화학적인 특성에 대하여 분석하고 연구할 수 있었다. 간세포를 이용한 연구에서 지방산 산화효소가 미토콘드리아와 관련이 있음이 밝혀졌다. (Andrews RM, et al., 1999)

이러한 미토콘드리아 구조와 기능에 대한 연구가 진행되고 있을 때에 1963년 미토콘드리아의 연구 역사에 또 하나의 획기적인 발견이 이루어졌다. 미토콘드리아 안에는 세포핵 디옥시리보핵산(DNA)와 별도로 독립적인 DNA가 존재함이 이 때 발견된 것이다. 이미 효모균 연구를 통해 멘델의 유전 법칙을 따르지 않는 세포질 유전이 있음이 밝혀지면서, 미토콘드리아만의 독립적인 유전물질이 있을 것이라는 예측은 있었고, 마침내 그 존재를 증명할 수 있게 되었던 것이다. 인체에서는 1967년에서야 비로소 처음 그 구조가 밝혀졌다. 이

발견으로 세포핵 유전자와 미토콘드리아의 유전자가 세포 안에서 어떻게 작용하는지에 대해서 새롭게 이해하게 된 계기가 되었다. 또한 이 발견은 미토콘드리아의 유래가 공생에서 기원하였다는 가설을 뒷받침해주는 증거로서도 의미가 있었다. (Andrews RM, et al., 1999, Clayton DA, 1992, Moraes CT, et al., 2002, Scheffler IE, 2008)

미토콘드리아 DNA 염기서열에는 다양한 변이가 발생할 수 있고, 이렇게 시간이 흘러감에 따라 변이가 축적될 것이며, 이렇게 축적된 변이는 분자생물학적인 시간의 척도가 될 수 있을 것으로 보아 미토콘드리아 DNA 염기서열 비교를 통해 인류의 기원과 이동에 대해 추정해 보는 연구가 시작되었다. 이러한 연구를 통해 밝혀진 유전적 다양성은 유전학, 계통발생학 등에서의 연구 주제였을 뿐만 아니라 법의학 개인식별 영역에서도 관심을 갖기 시작하였고, 유전적 다양성을 개체식별에 응용하였다. 1981년에 인체의 미토콘드리아 DNA의 표준전체염기서열이 발표되었으며, 이를 “Cambridge Reference Sequence, CRS”로 명명하였다. 이 염기서열은 인류 뿐만 아니라 모든 생물종에서 최초로 인류의 미토콘드리아 DNA 염기서열을 밝혀낸 연구이기도 하였다. 다만 그 때 당시 모든 유전자 부위가 다 해독된 것은 아니었고, 남아있던 밝혀지지 않았던 유전자는 1986년에 이르러서야 그 해독이 완성되었다. 1999년에는 CRS와 다른 연구결과에서 알려진 미토콘드리아 DNA 염기서열과 비교해 보았을 때, 일부 뉴클레오티드에 차이가 있음이 밝혀졌다. 이러한 차이는 실험적 오류 및 드문 다형태(polymorphism)로 보고, 이를 개정하여 “revised Cambridge Reference Sequence, rCRS”라고 명명된 개정 표준 미토콘드리아 DNA 염기서열을 발표하였다. 2012년에는 개정캠프리지표준서열이 유럽인의 하플로그룹에 속한 것으로 알려지면서 계통발생학적 특성을 담아 개정된 개정된 인류표준서열(Reconstructed Sapiens Reference Sequence)가 제안되었으나, 여러 연구에서 rCRS를 기준으로 분석해왔기 때문에 아직도 rCRS를 표준서열로 사용되고 있다. 이러한 표준염기서열 및 유전자의 해독 정보는 법의학의 개체식별뿐만 아니라 하플로그룹/하플로타입 연구에 따른 계통발생학 연구, 미토콘드리아 유전학적 연구, 질병학적 연구의 중요한 계기가 되었다. (Behar DM, et al., 2012, Alvertz B, et al., 2008, Anderson S, et al., 1981, Andrews RM, et al., 1999, Bandelt HJ, et al., 2006, Chomyn A, et al., 1986, Scheffler IE, 2008, van Oven M, et al., 2009,)

1.2. 미토콘드리아 유전 시스템

1.2.1. 미토콘드리아의 성장과 분열과 미토콘드리아 DNA

미토콘드리아는 세포내 구조물이지만 세균 같은 미생물처럼 기존에 존재하던 미토콘드리아에서 새로운 미토콘드리아로 성장하거나 새로이 분열되는 방식으로 태어난다. 세포분열이 일어나는 세포 안에서는 미토콘드리아의 수는 두 배가 되었다가 각 딸세포에 각각 동등하게 분배된다. 세포분열을 하지 않는 세포일지라도 미토콘드리아의 수명이 다하거나 좀 더 많은 수의 미토콘드리아를 필요로 할 때 미토콘드리아의 성장과 분열을 통해 이러한 수요를 충족시킨다. 이에 대해서는 실제 살아있는 세포에서 미토콘드리아를 관찰해 보았을 때 역동적이어서 자주 분열하고 융합하며 모양을 변형시킴이 밝혀지면서 증명되었다. 미토콘드리아의 수와 모양은 여러 가지 다양한 생리적 조건에 따라 시시각각 달라지며 심지어 동일 세포안에서조차도 미토콘드리아의 분열과 융합의 비율에 따라 상대적으로 변화한다. 이러한 미토콘드리아의 성장과 분열은 두개의 축으로 구성된 유전 시스템이 관여하는 복잡한 과정을 거친다. 그 시스템의 한 축은 미토콘드리아 안에 세포핵 DNA와는 독립적으로 존재하는 DNA, 이에 따라 리보핵산(RNA)를 합성하고 단백질을 합성을 하는 자체 유전시스템이고, 다른 한 축은 세포핵 DNA의 유전시스템이다. 즉 미토콘드리아 유전체의 유전시스템을 통해 전사 및 합성된 단백질과 세포핵 유전체의 유전시스템에서 전사 및 합성된 단백질이 상호작용하여 기능함으로써 미토콘드리아 성장과 분열에 관여한다. 세포핵 DNA를 통해 합성된 단백질은 미토콘드리아 내로 운반되지만, 미토콘드리아 내에서 합성된 단백질은 세포질로 나가지 않고 그대로 머무르기 때문에 이들 단백질은 일방통행의 움직임을 보인다. 예외적으로 세포질로 단백질을 내보낼 때가 있지만 이는 오직 세포자멸사가 진행되는 경우에서만 일어난다. (Hayashida K, et al., 2005, Scheffler IE, 2008)

1.2.2. 미토콘드리아 DNA 복제

미토콘드리아의 성장과 분열에 중요한 역할을 하는 미토콘드리아의

유전시스템에 있어서 미토콘드리아 DNA의 복제는 세포핵 DNA가 복제되는 시기인 세포분열주기의 S기에서만 국한되어 일어나지 않고, 세포분열주기와 상관없이 일어난다. 미토콘드리아 안에는 여러 복제수의 DNA가 있지만 이들 중에서 복제하려는 DNA는 무작위로 선택된다. 따라서 어떤 미토콘드리아 DNA는 세포분열 주기 동안 한번 이상 여러 차례 복제되는 반면 어떤 미토콘드리아 DNA는 전혀 복제가 일어나지 않는다. 그럼에도 불구하고 매 세포분열주기마다 미토콘드리아의 DNA의 전체 양은 2배가 되도록 일정하게 조절되고 있으며, 또한 각 딸세포에 동일한 양의 미토콘드리아 DNA가 분배되도록 조절된다. 미토콘드리아 DNA가 복제되는 장소는 세포핵 근처에 있는 미토콘드리아의 내부이다. 핵을 제거한 세포에서는 미토콘드리아의 복제가 완전히 정지되는 것을 관찰한 실험을 통해 증명되었으며, 이를 통해 미토콘드리아 DNA 복제에 필요한 단백질이 세포핵 DNA에도 암호화되어 있음을 발견하게 된 계기가 되기도 하였다. (Alberts B, et al., 2008, Bogenhagen D, 1977, Bogenhagen DF, 2012, Scheffler IE, 2008)

1.2.3. 미토콘드리아 DNA 변화

미토콘드리아 DNA의 복제가 일어날 때, 이상적으로는 염기서열 정보가 그대로 복제되어야 할 것이다. 그러나 실제로는 복제과정에서 미토콘드리아 DNA 염기서열에 돌연변이가 발생하거나 DNA 복제수에 변화가 발생한다. 이러한 DNA의 변화를 유발하는 원인으로는 외적 원인과 내적 원인이 있다. 외적 원인에는 주로 미토콘드리아 단백질과 막의 지질성분의 산화인산화가 일어나면서 수반하는 부산물(활성화산소 등)이 있다. 미토콘드리아 DNA는 지정학적으로 산소를 이용하는 에너지 대사가 활발하게 일어나는 미토콘드리아 내부에 함께 위치하고 있으며 이 대사 과정에서 활성화산소가 생성되는 곳과 근접하여 위치하고 있다. 또한 히스톤과 같은 보호기능을 해주는 단백질의 부재로 미토콘드리아 DNA는 산화에 의한 손상에 매우 취약할 수 밖에 없다. 특히 인체의 경우, 활성화산소에 의해 유발된 미토콘드리아 DNA 염기서열의 손상은 세포핵 DNA의 손상에 비해 훨씬 더 광범위하면서 오래 유지된다. 활성화산소는 염기뿐만 아니라 DNA의 뼈대에 해당하는 당인산염에도 손상을 줄 수 있고, DNA 가닥이 끊어지거나 가교(crosslink)를 형성하기도 한다. 그 외 외인성 원인으로 여러 가지

유전자 독성물질(산업물질, 자외선, 방사선, 흡연, 화학물질, 환경독성물질, 약물 등)이 있다. 미토콘드리아 내막은 음전하를 띄고, 많은 독성화학 물질들은 양전하를 띄는 친지질성 물질이기 때문에, 이 물질들이 미토콘드리아 내부로 축적되고, DNA는 손상 받기 쉬운 상태가 된다. 내적 원인으로는 미토콘드리아 DNA가 복제되는 과정에서 자연적으로 발생할 수 있는 오류로 인하여 생성된 점 돌연변이나 결실 등이 있다. 미토콘드리아에만 있는 DNA 중합효소 γ 는 미토콘드리아 DNA의 복제와 복구를 담당하는데, 내적 원인에 의한 손상은 이 효소의 착오로 발생하게 된다. (Akhmedov AT, et al., 2015, Alberts B, et al., 2008)

1.2.4. 미토콘드리아 DNA 복구시스템

연구 초기에는 미토콘드리아 DNA염기서열의 변화가 발생할 때 그에 대한 복구 시스템은 없을 것으로 여겨졌다. 그 이유는 손상 받은 미토콘드리아 DNA 전체를 분해를 시키고 손상 받지 않은 DNA를 주형으로 새로 DNA를 복제하여 기존의 손상 받은 DNA를 대신하기 때문이다. 각 세포당 수백 개에서 수천 개 복제수의 손상 받은 DNA가 분해된다. 그러나 이후 수년에 걸친 연구를 통해 미토콘드리아에도 세포핵 DNA 복구시스템과 거의 유사한 DNA 복구 시스템이 있음이 밝혀졌다. 그 종류로는 “염기절단복구 (base excision repair), DNA 가닥 복구, 불일치염기 복구, 상동재조합 (homologous recombination), 비상동말단융합 (nonhomologous end joining)” 등이 있다. 다만 미토콘드리아에는 세포핵 DNA 복구시스템과 달리 뉴클레오티드 절단복구 시스템이 없다. 복구시스템에 관여하는 단백질은 모두 세포핵 DNA에 암호화 되어 있어서 세포핵에서 전사 및 합성되어 미토콘드리아 내로 운반된다. 염기절단복구에는 짧은 서열복구과 긴 서열복구 등 두 종류가 있다. (Akhmedov AT, et al., 2015, Alberts B, et al., 2008)

1.2.5. 미토콘드리아 DNA 변화와 복구시스템의 불균형 및 유전시스템에 미치는 영향

DNA 염기서열의 복제수의 변화나 돌연변이를 방지하기 위해 분해 및 복제, 또는 복구시스템이 존재함에도 불구하고, 미토콘드리아 DNA는

세포핵 DNA보다 10배 이상으로 많은 뉴클레오티드 치환이 발견된다. 그 이유는 첫째 미토콘드리아의 DNA 복제과정에서 정확성이 떨어지고, 둘째 DNA 복구는 비효율적이기 때문이다. 미토콘드리아 DNA 전체염기서열의 복제와 복구, 미토콘드리아 유전체의 전사, 단백질 합성 과정에서 오차율은 상대적으로 높고 정확성이 떨어진다. 그럼에도 불구하고 미토콘드리아 유전 시스템에서 형성된 생산물은 상대적으로 거의 손상되지 않는데, 이는 세포핵 유전시스템에 비해 미토콘드리아 유전시스템이 상대적으로 단순하기 때문이다. (Akhmedov AT, et al., 2015, Alberts B, et al., 2008)

미토콘드리아가 이런 별도의 유전시스템을 유지하기 위해서는 리보솜 단백질, 합성효소들, 진행 및 수정에 관여하는 효소 등 이 시스템에 관여하는 90여개 이상의 단백질 합성이 필요하고, 이를 위해 핵 유전체에 별도로 동일한 수의 유전자를 통해 암호화시켜야 한다는 점에서 비효율적으로 보인다. 이에 대해서 초기 원시세포와 포식당한 세균의 공생의 개념을 적용해 본다면, 미토콘드리아의 DNA가 오랫동안 점진적으로 세포핵 DNA로 전달되어 왔고 이제는 전달과정의 마무리단계에 있을 것으로 보인다. 만약 세포핵 DNA로의 전이를 완전히 마치면 미토콘드리아의 유전 시스템은 기능을 상실할 것으로 생각해 볼 수 있을 것이다. (Akhmedov AT, et al., 2015, Alberts B, et al., 2008)

1.3. 미토콘드리아 DNA의 유전학적 특성

1.3.1. 미토콘드리아 DNA의 유전방식: 모계유전

미토콘드리아 DNA의 유전은 세포핵 DNA의 유전 법칙인 멘델의 유전법칙을 따르지 않는다는 특징은 효모균 연구를 통해 알려진 비멘델유전 또는 세포질유전으로서 알려져 있었다. 다만 효모균의 미토콘드리아의 유전과 인체의 미토콘드리아 다른 점이라면 효모균의 경우 부모 양쪽에서 반반씩 미토콘드리아 DNA를 받는다는 점일 것이다.

인체의 경우 미토콘드리아 DNA를 모계유전으로 보는 이유는 다음과 같다. 첫째 난자와 정자가 수정할 때, 난자 세포만이 세포질을 구성하고 정자는 거의 기여하지 않아서 모계 한쪽에서만 미토콘드리아 DNA를

전달하게 된다. 수정된 난자는 약 2,000여개의 복제된 미토콘드리아를 가지고 있으며, 한두 개를 제외한 나머지 모든 미토콘드리아는 모두 모계에서 유전된 것이다. 다른 연구에 의하면 성숙한 난자는 수천 개의 미토콘드리아가 있고, 미토콘드리아 DNA는 약 100,000여개 이상의 복제수가 있다고 하였다. 둘째는 특이적으로 부계에서 오는 미토콘드리아를 인지하는 기전이 있어서 난자와 정자가 수정될 때 들어오는 소수의 부계 미토콘드리아를 제거하기 때문으로 본다. “수정란 안에 있는 부계 미토콘드리아는 4세포분할기와 8세포분할기를 거치면서 유비퀴틴에 의해 수정된다. 유비퀴틴 신호는 남성 생식기의 정자 미토콘드리아에서도 확인되는 점으로 비추어 수정 전에 이미 정자의 미토콘드리아는 선택적 퇴행을 위해 유비퀴틴으로 꼬리표를 붙인 것”으로 설명하였다. 수정 후에 유비퀴틴으로 표시된 부계 미토콘드리아는 단백질분해효소복합체(proteasome)나 용해소체에 의해 분해되는 것으로 보인다. 미토콘드리아의 모성유전은 동물에서 먼저 관찰되었고, 인간에서는 1980년 처음 3가족을 대상으로 제한효소를 이용한 기법으로 미토콘드리아 DNA를 비교분석하였다. 가계도를 분석하였을 때, 멘델의 유전법칙 즉 우성 또는 열성 유전과는 다르고 반성유전과도 맞지 않았고, 모계를 통해 나타나는 모성유전임을 증명하였다. (Alberts B, et al., 2008, Giles RE, et al., 1980, Hayashida K, et al., 2005, Holland MM, et al., 1999, Sato M, et al., 2013, Scheffler IE, 2008)

드물지만 인체에서 부성 미토콘드리아 DNA가 있다는 문헌 보고가 있었고 인체에서도 양측 부모의 미토콘드리아 유전체의 제조합은 과연 일어나지 않는 것인지에 대한 의문이 없었던 것은 아니다. 그러나 현재까지는 여러 연구 및 연구자들 사이에서 미토콘드리아의 클론형성능(clonality) 중 개체내에서 미토콘드리아 DNA는 동형세포질성이라고 간주한다. 또한 인류에서 미토콘드리아 DNA 제조합이 일어난다고 고려할 만한 충분한 과학적 근거는 아직 알려진 바가 없기도 하였다. 1997년의 연구에서 법의학 실무에서 사용하는 같은 방법(증폭시킨 DNA를 직접 염기서열분석하는 기법)을 적용하여 69쌍의 아버지와 아들의 미토콘드리아 DNA 염기서열을 직접 비교분석해 보았을 때 부계 미토콘드리아 DNA가 있었던 사례는 없었다.

“만약 이형세포질성(heteroplasmy)이 부계에서 온 미토콘드리아 DNA라면, 전혀 친족관계가 없는 무작위로 선택된 2명의 코카시안 인종을 대상으로 미토콘드리아 DNA의 염기서열을 비교분석하였을 때,

일반적으로 조절부위에서 8개 이상의 변이가 관찰되는 점을 감안하였을 때, 부계에서 전달되어 혼합된 DNA에서는 더 많은 부위에서 변이가 관찰되어야 할 것이다.” (Budowle B, et al., 2003, Coble MD, et al., 2004, Elson JL, et al., 2006, Hayashida K, et al., 2005, Holland MM, et al., 1999, Parsons TJ, et al., 1997, Scheffler IE, 2008, Schwart M, et al., 2002)

1.3.2. 미토콘드리아 DNA 유전과 이형세포질성

앞서 설명한 대로 미토콘드리아 DNA 복제과정에서 돌연변이 등 변화가 발생하고, 세포핵 DNA보다 오차율이 훨씬 더 높다. 이러한 특성 덕분에, 각 개체에서 각기 다른 고유의 다양한 DNA로 나타날 수 있고 각각의 변이는 독립적으로 복제되고 분리될 수 있으며, 모계를 통해 후손에게 이러한 변이를 전달할 것이다. 특히 돌연변이의 여러 유형 중 대단위의 결실은 유전이 되지 않지만 점 돌연변이는 대개 유전된다. 따라서 각 개체의 미토콘드리아 DNA에는 각 모계 조상에서 물려받은 각기 고유한 ‘유형’이 있을 것이다. 그러나 이러한 모계의 고유한 유형과 구별되는 또다른 고유한 유형이 있음이 밝혀졌다. 미토콘드리아 DNA 세대 간에 전달하는 과정에서 변이가 전달되는 정도를 제한하는 ‘유전적 병목(genetic bottleneck)’ 기전이 있음에도 불구하고, 동일 개체 안에서 2개 이상의 미토콘드리아 DNA 유형이 혼합되어 있는 현상, 즉 이형세포질성(heteroplasmy)이 발견되었다. 다시 말하면 각 개체를 구성하는 각 세포 안의 미토콘드리아 DNA에서 살아가는 동안 돌연변이가 제각각 발생할 것이다. 그리고 각자 돌연변이가 발생한 미토콘드리아 DNA와 돌연변이 발생이 없는 미토콘드리아 DNA의 비율은 각 세포마다 다르게 나타날 뿐만 아니라 동일 개체내의 각 장기조직마다도 다르게 나타날 것이다. 이형세포질성에 대한 초기 연구는 망막을 가지고 진행하였는데, 망막이 신경조직의 연장으로서 노화에 따라 미토콘드리아 DNA의 돌연변이가 증가하는 점에 착안하여 연구를 하였으나 이형세포질성에 있어서는 개체내 변이는 아주 적으며, 따라서 각 개체는 동형세포질성(homoplasmy)으로 간주할 수 있을 것으로 보았다. 이후 여러 연구들에서 이러한 관점은 이후 상당기간 계속 지속되었는데 아마도 당시 염기서열분석기법의 수준으로는 이형세포질성을 배경잡음과 구별하기 어려웠기 때문이기도 했을 것이다. 그러나 과학기술의 발달로

개선되거나 새로운 염기서열분석기법의 도입으로 이형세포질성을 더 잘 발견할 수 있었다. 다만 현저하게 나타난 뉴클레오티드만 변이 검출로 인정하고 나머지는 원인 미상의 불확실한 염기로 간주하였었다. 니콜라스 II세 황제의 유골에 대한 법의학 감정이 진행되던 중 발견된 점 이형세포질성(point heteroplasmy)을 기점으로 이형세포질성에 대한 연구가 이어졌다. 일반적으로 이형세포질성의 빈도는 비교적으로 낮아서 인구의 2-8% 정도로 알려졌다. (Alberts B, et al., 2008, Bandelt HJ et al., 2006, Bendall KE, et al., 1996, Hasegawa M, et al., 1993, Hauswirth WW, et al., 1982, Holland MM, et al., 1999, Koehler CM, et al., 1991, Parsons TJ, et al., 1998, Poulton J, et al., 2000, Scheffler IE, 2008, Wakeley J, 1993)

이어진 여러 연구를 통해 이형세포질성의 형성과 각 수준이 변화하는 기전이 발견되었다. 미토콘드리아 DNA의 복제와 분해는 세포분열에 따른 세포핵 DNA의 복제와 상관없이 계속적으로 일어나고 각각의 복제나 분해의 대상은 무작위로 선택된다고 앞서 설명하였다. 이러한 특징은 세포분열이 거의 없는 것으로 알려진 근육세포나 뇌신경세포에서 왜 이형세포질성의 수준이 다르게 나타나는지, 그리고 미토콘드리아 DNA의 돌연변이에 따른 질병의 특성을 이해하게 해준다. 또한 영양분리 즉 “세포질의 무작위 또는 불공평한 구획과 분리”는 혈액세포와 같은 계속 증식하는 세포에서도 이형세포질성 수준이 달라지게 하였다. 뿐만 아니라 “유전적 병목”을 통해 이형세포질성이 후손에게 전달됨으로서 모계의 유형과는 또다른 유형이 나타날 수 있게 되었다. 따라서 이형세포질성은 모계에 해당하는 친족사이에서의 차이뿐만 아니라 동일 개체 내의 각 장기 및 조직의 세포 사이에서도 다른 이형세포질성 비율이 나타날 수 있다는 것이다. “병목” 이론은 암소에 대한 연구를 통해 제시되었다. 동형세포질성에서 이형세포질성으로, 동형세포질성에서 다른 동형세포질성으로의 변화가 암소의 각 세대에서 발생한다는 것이 발견되었다. 이러한 현상을 설명하기 위하여 난자의 발생 과정 중 어떤 단계, 또는 생식세포 발달과정 동안 미토콘드리아 DNA의 수가 비교적 적은 수로 줄어드는 ‘병목’ 이론이 제시되었다. 즉, 병목현상 초기에 일어나는 현상처럼, 미토콘드리아 DNA 일부 군이 전달될 것이다. 그리고 전달된 미토콘드리아 DNA는 성숙 난자에서 최대 100,000 가량의 복제수로 복제될 것이고 이 과정에서 원래의 미토콘드리아 DNA 염기서열과 다른 분율의 이형세포질성 변이가 나타날 것이며, 이후 진행되는

감수분열과정 중에 또다른 분율의 이형세포질성 변이를 지닌 채 분리된다. 인체의 난소 발생과정에서도 이러한 미토콘드리아 DNA 병목 현상이 발생함이 관찰되었다. 쌍둥이와 그 가계를 대상으로 연구하였을 때 세대사이에 다른 분율의 이형세포질성 변이를 보임이 관찰되었다. 감수분열과정 중 병목을 거치면서 2에서 100개 사이의 미토콘드리아 DNA 복제수(평균 3-20)가 전달되는 것으로 추정하지만, 실제 병목을 통해 전달되는 미토콘드리아 DNA의 양은 일정하게 전달된다고 하기보다는 매 전달 단계에서 확률적으로 달라질 수 있다. 이렇게 유전을 통해 전달받은 미토콘드리아 DNA의 이형세포질성은 각 개체내에서 장기마다 그 수준이 무작위로 다르게 나타날 수 있게 된다. 결국 이형세포질성의 수준은 미토콘드리아 DNA를 오랜 시간 보존 및 유지하는 관련 인자들을 통하여 각 개체의 미토콘드리아 유전체 수준에서 어느 정도 조절될 것이다. 이 뿐만 아니라 세포핵의 유전자와 관련된 인자도 이형세포질성의 수준의 조절에 관여한다. 이러한 특징은 미토콘드리아 DNA 돌연변이와 관련된 질병의 발병기전을 이해할 수 있게 하며, 미토콘드리아 DNA 돌연변이의 유전적 전달과 인류의 진화를 이해하는 데에도 중요할 것이다. (Alberts B, et al., 2008, Bandelt HJ et al., 2006, Bendall KE, et al., 1996, Hasegawa M, et al., 1993, Hauswirth WW, et al., 1982, Holland MM, et al., 1999, Koehler CM, et al., 1991, Parsons TJ, et al., 1998, Scheffler IE, 2008, Wakeley J, 1993)

이형세포질성에는 하나의 염기부위에 다른 염기가 치환되어 형성되는 점 이형세포질성 뿐만 아니라 수개의 염기부위에 연속적으로 변이가 형성된 길이 이형세포질성(length heteroplasmy)이 있다. 길이 이형세포질성은 과변이부위의 다시토신뻘기 부위(polycytosine stretches)에서 흔하게 나타난다. 과변이부위 I의 16189번 위치의 뉴클레오티드는 티민(T)이어서 각 양쪽의 시토신(C)의 흐름을 끊어주는 역할을 한다. 그러나 이 부위가 T에서 C로 변이가 발생하면 C가 연속적으로 배열되기 때문에 정확성이 낮은 것이 특징인 미토콘드리아 DNA 중합효소에 의해 C의 연속적인 배열이 생성된다. 이는 각 개체마다 다른 길이의 C 뻘기가 형성됨으로써 염기서열분석에서 오차가 나는 부분이기도 하다. 길이 이형세포질성은 과변이부위 II의 C뻘기에서도 나타날 수 있지만, 이 경우 쉽게 알아볼 수 있는 뚜렷한 길이 변이가 있다. (Alberts B, et al., 2008, Bendall KE, et al., 1996, Hasegawa M, et al., 1993, Hauswirth WW, et al., 1982, Holland MM,

et al., 1999, Koehler CM, et al., 1991, Parsons TJ, et al., 1998, Scheffler IE, 2008, Wakeley J, 1993)

이형세포질성에 대한 연구를 통해 발견된 중요한 점은 미토콘드리아 DNA의 각 뉴클레오티드 위치는 동일한 확률로 이형세포질성이 발생하는 것이 아니라, 자주 호발하는 특정 부위(“hot spot”)가 있다는 점이다. 이형세포질성이 자주 발생하는 염기서열 부위는 인류가 생존해온 오랜 시간동안 변이가 형성되고 축적되어 결국 각 개체사이의 차이를 만드는 염기서열부위에 상관관계가 있을 것이었다. 러시아의 황제 니콜라스 II세의 유골의 법의학 감정 사례에서 보여주듯이 이형세포성질이 미토콘드리아 DNA 분석을 이용한 개인식별에 있어서 식별력을 증강시키는데 유용할 것으로 생각된다. 다만 이 경우 개체의 발달과 생존기간동안 개체내에서 발생하는 변이와 유전적으로 전달되는 변이와 구별되어야 할 것이다. 일부 사례에서는 드물기는 하지만, 원래의 뉴클레오티드가 대부분 변이로 치환되어 동형세포질성으로 보일만큼 큰 차이를 보이기도 해서 개인식별감정에서 개체식별에 대한 해석 및 감정에 있어서 어려운 문제가 될 수 있다. 그외 이형세포질성의 수준이 질병의 발현에 영향을 줄 수 있는 점도 임상의학적으로 중요한 부분이다. (Alberts B, et al., 2008, Bendall KE, et al., 1996, Hasegawa M, et al., 1993, Hauswirth WW, et al., 1982, Holland MM, et al., 1999, Koehler CM, et al., 1991, Parsons TJ, et al., 1998, Scheffler IE, 2008, Wakeley J, 1993)

1.4. 미토콘드리아 DNA의 구조

1.4.1. 미토콘드리아 내 DNA 구조

미토콘드리아의 DNA는 원형의 이중나선구조로 되어 있으며, 질병 등 비정상적인 상태에서는 이합체(dimer)로 형태가 바뀌기도 한다. 또한 미토콘드리아 DNA는 미토콘드리아 구조의 영향을 받는다. 미토콘드리아의 내부 공간에는 여러 작은 공간들로 나뉘어 있는데, 그러한 공간들을 나누는 격막은 내막으로 형성되어 있다. 이들 각 공간에는 여러 복제 수의 미토콘드리아 DNA가 들어있으며, 이를 핵모양(nucleoid)라고 하는데, 세포핵내 염색질보다는 세균의 DNA와

유사하여 히스톤이 없다. 미토콘드리아 핵모양은 비교적 안정된 유전물질로 인체세포에서는 하나의 핵모양당 평균 1.4개 ~ 7.5개의 미토콘드리아 DNA로 복제수로 구성되어 있으며 이들 DNA를 코팅하는 것처럼 결합하는 단백질이 있다. 따라서 미토콘드리아 내부에 이러한 작은 공간들의 형성의 정도는 가지고 있는 미토콘드리아 DNA의 복제수에 따라 달라진다. 미토콘드리아 DNA의 복제수가 많다는 것은 일부 DNA에 돌연변이가 생겼을 때 그로 인한 유전자 기능의 공백을 다른 정상 DNA가 상보적으로 대신 기능해주는 등의 보호역할을 담당함을 의미한다. 미토콘드리아 핵모양과 관련된 단백질에는 미토콘드리아 DNA와 결합하는 단백질(single strand DNA binding protein), DNA 나선구조의 나선을 조절하여 핵모양내에서 미토콘드리아 DNA의 압축정도에 관여하는 단백질(high mobility group box protein TFAM), 핵모양의 안정성 유지에 관여하는 ‘prohibitin’ 단백질, TFAM 단백질을 분해시켜서 미토콘드리아 DNA 복제수를 조절하는데 관여하는 ‘Lon’ 단백질분해효소, 리보솜 관련 단백질 등이 있다. 또한 세포골격을 유지하는 단백질이 미토콘드리아 기질내로 들어와 미토콘드리아 핵모양과 접촉하는 것이 알려졌는데 아직 그 의의에 대해서는 아직 밝혀지지 않았다. (Alberts B, et al., 2008, Bogenhagen DF, 2012, Scheffler IE, 2008)

1.4.2. 미토콘드리아의 DNA 가닥의 구조와 구성

인체에서 미토콘드리아의 DNA는 16,569개의 뉴클레오티드 쌍으로 구성된 원형의 DNA로 13개의 단백질을 합성하는 유전자가 포함되어 있으며, 2개의 리보솜RNA 구성 성분과 22 전이RNA들이 있다. 주요 염기 구성에서 구아닌과 시토신 등의 염기가 비대칭적으로 분포하는 점 때문에 무거운 가닥(heavy chain)과 가벼운 가닥(light chain)으로 구분한다. 바깥쪽 DNA가닥이 무거운 가닥이고, 안쪽 DNA가닥이 가벼운 가닥에 해당하고, 바깥쪽 DNA에 주로 유전자가 암호화되어있다. (그림 1 참조) 이러한 16,569개의 뉴클레오티드로 구성된 DNA는 세포핵 DNA에 비해 비교적 작은 크기의 유전체이다 보니 초기에는 DNA 염기서열분석 연구 대상으로 최적이었다. 1981년 미토콘드리아 DNA를 구성하는 전체 뉴클레오티드를 완전히 분석하여 발표하였다. 당시 알려진 미토콘드리아 전이RNA 염기서열과 부분적으로 알려진 아미노산 서열과 함께 비교 분석함으로써 원형의

DNA 지도가 완성되었다. 인체의 미토콘드리아 DNA를 세포핵 DNA, 다른 유사한 엽록체의 DNA와 세균의 DNA 등과 비교해 보면, 거의 모든 뉴클레오티드는 단백질이나 전이RNA를 암호화하고 있는 염기서열의 일부로 여겨지며, 이러한 암호 부위는 서로 밀접하여 연이어 있어서 조절부위 염기서열은 적은 비율로 구성되어 있다. 또한 미토콘드리아 단백질을 합성하기 위해서는 겨우 22개의 전이RNA가 필요해서 코돈과 대응코돈이 짝을 이루는 부분이 느슨하게 되어 있어서 많은 전이RNA가 세번째 동요부위(Wobble position)의 뉴클레오티드들 중 하나를 쉽게 인지하게 하여 전이RNA가 결국 결합하게 되고, 이러한 짝형성은 적은 양의 전이RNA만으로도 단백질 합성이 일어날 수 있게 한다. 마지막으로 유전자 암호의 의미가 다양하다는 것인데 미토콘드리아 유전자 염기서열과 그에 대응하는 단백질의 아미노산 서열을 비교분석해 보면, 64 코돈 중 4개의 코돈이 같은 코돈임에도 다른 아미노산으로 전사된다. (Alberts B, et al., 1008, Anderson S, et al., 1981, Chomyn A, et al., 1986, Clayton DA, 1992, Garrigan D, et al., 2006, Moraes CT, et al., 2002, Scheffler IE, 2008, Wills C, 1995)

미토콘드리아의 DNA는 유전자 정보가 있는 암호부위(coding region)와 유전자가 아닌 염기서열이 모인 부분인 조절부위(control region)로 구성되어 있다. 조절부위는 길이 약 1,125 염기쌍으로 구성되어 있으며, DNA의 복제가 시작되는 부위일 뿐만 아니라, RNA 전사의 시작부위(promotor)가 있는 부위이다. 1981년에 발표된 캠브리지 표준염기서열 (Cambridge reference sequence, CRS)은 인위적으로 조절부위 중앙에서부터 염기서열번호를 시작하였기 때문에, 조절부위는 1번에서 576번사이와 16,024번에서 16569번사이에 위치한 염기서열을 말하며, 나머지 염기서열 (577번에서 16023번까지)이 암호부위에 해당한다. (Anderson S, et al., 1981)

암호부위의 유전자의 순서는 안정적으로 유지되어 왔으나 개별 유전자 사이의 뉴클레오티드의 염기서열은 종마다 현저하게 다르며 특히 인류에서는 상당한 염기서열변이의 다양성 즉 다형태(polymorphisms)가 있음이 관찰되었다. 이러한 점 때문에 인류학 뿐만 아니라 법의학에서 이 부위에 대해 많은 관심을 기울이고 있다. (Holland MM, et al., 1999, Scheffler IE, 2008)

1.4.3. 세포핵의 미토콘드리아 DNA 염기서열(numt)

미토콘드리아 DNA는 미토콘드리아 내에서만 성장하는 것이 아니라 세포핵 DNA의 염색체 내에서 여러 조각으로 있으면서 성장한다. 이는 인체뿐만 아니라 미생물, 동물, 식물 등 여러 연구에서 확인된 현상으로, 세포핵의 DNA 염기서열 중에서 미토콘드리아 DNA와 거의 유사한 부분이 있어서 이를 세포핵 DNA에 삽입된 미토콘드리아 DNA 즉 세포핵의 미토콘드리아 DNA (numt; nuclear inserts of mitochondrial DNA)라고 불리운다. 이는 인류의 진화 및 이주를 이해하고, 고대 시료의 미토콘드리아 DNA를 해석하는데 있어서 미토콘드리아 DNA와 numt를 구별하는 것이 중요하지만 또한 질병의 발생기전을 이해하는데에도 중요한 부분이었다. 인체에서는 각 염색체 뿐만 아니라 전체 염색체에서 612개의 numt가 다양한 염기서열의 길이로서 분포하고 있고, numt는 적어도 전체 세포핵 DNA의 약 0.016%를 차지할 것으로 추정하였다. 세포핵 DNA내로 삽입되는 기전으로는 미토콘드리아 DNA 그 자체의 삽입, RNA 중간매개체에 의한 삽입에 의해 발생할 것으로 본다. (Bandelt HJ et al., 2006, lopez JV et al., 1994, Woischnik M et al, 2002)

2. 법의학에서 미토콘드리아 DNA의 의의

2.1. 법의학에서 활용되는 미토콘드리아 DNA의 특성

2.1.1. 미토콘드리아 DNA와 세포핵 DNA

DNA에 대한 과학적 지식이 축적되고 분석기법이 발달함에 따라 이를 사법절차에 도입하여 활용하기 시작하였다. 생물학적 증거물로서 세포핵 DNA는 많은 정보를 줄 수 있다는 점에서 최적의 대상일 것이다. 다만 세포핵 DNA와 비교하였을 때 미토콘드리아 DNA가 지닌 몇가지 장점이 있어서 여전히 유용한 정보를 얻을 수 있는 부분이 있다. 첫째, 하나의 세포에서 세포핵 DNA는 두 개의 복제수 밖에 없지만, 미토콘드리아 DNA는 평균적으로 수천 개의 복제수를 가지고 있어서, 훨씬 더 민감한 분석이 가능하다는 점이다. 둘째로 미토콘드리아 DNA는 양쪽 부모에서 물려받지 않고, 재조합이 일어나지 않는

모계유전이라는 점이다.

2.1.2. 법의학 실무에서 미토콘드리아 DNA 분석의 장점

변질이 진행된 시료나 오래된 유골에서처럼 세포핵 DNA가 변성되는 경우, 손톱, 머리카락처럼 세포질만 남아있고 세포핵이 없어서 아예 분석이 불가능한 경우에서처럼 세포핵 DNA를 확보할 수 없는 경우에서도 세포질은 남아있기 때문에 미토콘드리아 DNA는 확보할 수 있다. 따라서 앞서 설명한 미토콘드리아 DNA의 장점들을 적용하여 추가적인 정보를 확보할 수 있으며, 또한 모계의 대조시료가 있는 경우 확보된 미토콘드리아 DNA 정보를 이용하여 개인식별, 법생물학 증거물에 대하여 추가적인 해석이 가능해진다. (Coble MD, et al., 2004, Coble MD, et al, 2009, Giles RE, et al., 1980, Scheffler IE, 2008, Seo Y, et al., 2000)

2.1.3. 개체식별 측면에서 법의학에서 미토콘드리아 DNA의 특징

미토콘드리아 DNA의 변화는 각 개체마다 다르게 나타나는 다형성을 만들고 이는 미토콘드리아 DNA 염기서열 중 특정 부위에서 높게 나타난다. 암호 부위에 비해 조절부위에서 각 개체 사이의 다형성이 높은 비율로 발생하는데, 이는 암호부위에 비해 조절부위 염기서열에서 선택적 제약이 상대적으로 낮기 때문으로 추정된다. 특히 이러한 조절부위의 다형성이 높게 나타나는 부분을 과변이부위라고 하며, 과변이부위 I은 16024번 뉴클레오티드와 16365번 뉴클레오티드 사이에 위치하고 있으며, 과변이부위 II는 73번 뉴클레오티드에서 340번 뉴클레오티드 사이에 위치하는데 이 부위들의 위치는 고정되어 있지는 않고 연구에 따라 조금씩 달라지기도 한다. (57번에서 372번 사이) 이러한 염기서열의 변이가 진화의 과정에서 형성된 미토콘드리아 DNA의 유전적 다양성으로 정의되며 이러한 유전적 다양성을 보이는 수많은 염기서열을 모은 데이터베이스 및 하플로그룹(haplogroup) 분류의 개념이 정립되었다. 또한 이러한 각 개체사이의 염기서열 변이 차이의 특성이 개인식별의 근간이 되었으며 실무적으로 조절부위를 중심으로 염기서열분석을 시행하게 된 근거가 되기도 하였다. (Holland MM, et al., 1999, van Oven M, et al., 2009)

2.2. 미토콘드리아 DNA, 계통발생학, 하플로그룹(haplogroup)

2.2.1. 미토콘드리아 DNA와 인류의 진화연구

미토콘드리아 DNA를 인류의 진화연구에 적용한 것은 1987년에 발표된 연구였다. 이 연구에서 여러 대륙에서 유래한 인종(34명의 아시아인, 21명의 호주 원주민, 26명의 뉴기니아 원주민, 46명의 코카서스인, 20명의 아프리카인)으로 구성된 147명의 사람들을 대상으로 하여 미토콘드리아 DNA에서 제한효소가 작용하는 부위를 분석하여 DNA 지도를 완성하였다. 이미 다른 선행된 다른 연구들을 통해 분자유전학 기법을 이용한 미토콘드리아 DNA 염기서열 분석을 통해 인류의 기원과 진화에 대한 연구가 가능할 것이라는 예상이 없었던 것은 아니었다. 그러나 여러 다양한 인구를 대상으로 분석한 이 연구결과를 통하여 미토콘드리아 DNA 분석을 통한 접근 방법이 현생 인류와 진화와 기원, 우리 조상들의 이주 형태에 관한 의문에 대하여 과학적으로 접근 가능함을 보여주었던 획기적인 계기가 되었다. “이 모든 미토콘드리아 DNA는 약 200,000년 전에 아마도 아프리카에서 살았을 것으로 추정되는 한 여성에서 유래되었다.” 라고 하는 이러한 기술은 이 연구 논문의 초록에 기술되었던 것으로, 이를 여러 매체에서 문자 그대로 인용하여 논란을 불러일으켰을 만큼 널리 알려진 인용구가 되기도 하였다. (Brown WM, et al., 1982, Cann RL, et al, 1987, Scheffler IE, 2008)

이후 분자생물학적 기술의 발전으로 더 많은 종류의 제한 효소를 사용할 수 있게 되었고, 중합효소 연쇄반응 기법의 적용, 특정부위의 직접적인 염기서열분석 기법 적용 등에 의해 더 세밀한 분석이 가능하게 되었을 뿐만 아니라, 지구상의 가장 먼 지역의 인류 미토콘드리아 DNA가 분석되어 인류의 기원을 설명하고자 하는 노력들이 이어졌다. 미토콘드리아 DNA의 진화의 비율은 세포핵 DNA의 진화 비율에 비해 더 큰 규모로 발생할 것이다. 따라서 미토콘드리아 DNA가 인류의 진화를 이해하는데 적합한 상세한 시간척도가 될 수 있다. 미토콘드리아 DNA의 염기서열 변화는 시간이 흘러감에 따라 축적되고, 같은 인종 군에서 다형성이 나타나서, 인류의 각 인종을 구별할 수 있는 다형성

또는 하플로그룹이 존재한다. 또한 체세포 돌연변이나 유전적으로 물려받은 변이로서 각 개체를 구별해주는 다형성이 되기도 한다. (Brown WM, et al., 1982, Cann RL, et al, 1987, Coble MD, et al, 2004, Scheffler IE, 2008)

여러 인종을 대상으로 미토콘드리아 DNA 염기서열을 분석했던 1987년 연구에서, 염기서열의 해독정보 자체는 논란의 여지가 없는 것이었으나, 그 해석은 쉽지 않았다. 처음에는 단순히 돌연변이의 숫자만을 비교했었다. 일정한 곳에 정착하여 오랫동안 거주한 인구에서는 이 인구의 표본에서 미토콘드리아 DNA의 다양성이 나타날 것으로 보았다. 다시 말하면, 시간이 흐르고 세대가 교체하면서 나타나는 뉴클레오티드 변화 즉 분자생물학적 시계는 계속 분침을 다투어가며 흘러갈 것이다. 반대로 만약 최근에 정착하기 시작한 인구라면 미토콘드리아 염기서열은 변이가 거의 없는, 비교적 동질성으로 나타날 것이다. 이러한 설명은 실제로 일어나는 현상으로 밝혀졌다. 이는 아프리카에서 미토콘드리아 DNA가 전해왔을 것이라고 볼 수 있는 근거로, 이에 부합하여 아프리카에서 현재까지는 가장 큰 유전적 다양성을 보여주었다. 아프리카인에서 관찰되는 변이의 전체 숫자를 감안하여 추정되는 분자생물학적 시계로서의 개념을 근거로 한 것이었다. (Brown WM, et al., 1982, Cann RL, et al, 1987, Coble MD, et al, 2004)

2.2.2. 미토콘드리아 DNA와 인류의 계통발생나무

처음 변이에 근거한 분자생물학적 접근방법이 제시되었을 때에는 제한효소기법의 특성상 상세한 분석이 어렵고 한계가 있는 점, 표본의 크기가 작은 경우 정보가 간과되거나 잘못 해석될 수 있는 여지가 있는 점, 아프리카인 미국인이 아프리카를 대표한다는 것은 치우침(편견, bias)이 있을 수 있는 점, 계통발생학적 나무(phylogenetic tree)의 개념을 수립한 방법론에 대한 의문이 제기된 점 등 여러 가지 비판과 논란이 있었다. 그러나 시간이 흐르고 기술이 발달하면서 이렇게 제기되었던 이러한 논란들은 더 이상 문제가 되지 않았는데, 이를테면 제한효소 기법의 경우 더 많은 종류의 제한효소를 추가하여 분석함으로써 분석방법을 개선시키거나, 전체염기서열분석을 시행하여 기존의 염기서열분석기법의 제한점을 극복할 수 있었고, 다른 연구를 통하여 여러 지역의 대표 인구에 대한 표본의 크기와 수를 늘려서

진행하면 극복할 수 있었다. 이러한 연구들에서 주로 선호되는 부위는 DNA 복사와 전사가 시작되는 부위가 포함되어 있는 조절부위로, 이 부분이 가장 빠르게 진화과정을 반영하기 때문이었다.

가장 적절한 계통발생학 나무를 제시하기 위하여 Phylogenetic Analysis Using Parsimony (PAUP)라고 명명된 새로운 컴퓨터 프로그램이 개발되었고, 이전의 여러 연구를 통해 얻어진 막대한 양의 정보를 이 프로그램을 이용하여 분석하였다. 1987년 발표되었던 여러 인종을 대상으로 분석했던 연구자료를 이 프로그램을 통하여 1991년에 다시 분석하였다. 미토콘드리아 DNA로 인류의 최초 조상은 약 200,000여년 전에 아프리카에 살았을 것이라고 하였다. 다만 당시 컴퓨터나 프로그램은 기술적으로 발전단계 초기로 적절한 계통을 잘 찾아내지 못하였고, 계통발생학 나무의 뿌리가 정의되지 않아서 불완전하였다. (Cann RL, et al, 1987, Coble MD, et al, 2004, Vigilant L, et al., 1991)

1996년 일명 “장식적 전정법 (topiary pruning)” 이라고 불리는 방법으로 앞서 연구를 통해 알려진 자료들을 다시 분석하였다. 이 방법은 상기 명명된 이름이 가리키는 것처럼 애매한 새 자료를 삭제하고 확실한 계통을 보여주도록 정리하려는 시도였다. 계통발생학적 나무 역시 실제 나무가 성장하는 것처럼 서로 다른 계통이 있고 각 계통의 염기서열 중 돌연변이가 잘 일어나는 부위에서 최근에 반복적으로 돌연변이가 형성된다면, 이는 기존 나뭇가지에서 자라나는 “새 가지”가 될 수 있을 것이다. 또한 이러한 ‘새 가지’의 계통이 더 중요한 기존 가지인 계통을 가려버릴 수 있다는 점에서, 가지치기가 필요하다고 보았다. 이렇게 정리된 나무는 계통분류의 가짓수를 줄여주고 단순화시키면, 여러 통계학적 방법에 의한 분석(가지치기, 가중치주기, 자동처리 등)에 적합하게 된다. 진짜 계통발생학적 나무에 가까워질 수 있기 위해서는 이러한 여러 통계학적 방법의 복합적인 조합에 의해 가능하다고 보았기 때문이었다. 이 접근방식으로 분석해 본 결과, 인류의 미토콘드리아 유전의 기원이 아프리카임이 직접적으로 증명되지는 않았으나, 가지가 정리되어 얻어진 계통발생학적 나무에 대한 분석결과는 아프리카가 기원의 가능성에 무게를 두었다. (Scheffler IE, 2008)

시간척도의 측정에 대해서도 논란이 있었다. 변이가 관찰된 모든 부위에서 다 같은 속도로 변화가 일어나는 것인가? 조절부위가 암호부위보다 더 빠른 속도의 변화를 보이는가? 코돈의 세 번째 위치에

나타나는 변이에 의한 변화가 더 빠른 속도로 발생하는가? DNA 염기서열에서 전이(transition)와 변이(transversion)의 발생속도를 서로 비교하면 어떻게 되는가? 이러한 의문들을 맞닥뜨려 인류 미토콘드리아 DNA 변이의 더 정확한 시계척도를 예측하기 위한 연구가 시도되었다. 아프리카에서 기원한 현생 인류는 20000 ~ 158000 년 전에 출현하였을 것으로 추정할 수 있었는데 이 분석결과는 현생 인류의 기원은 한 지역이 아닌 여러 지역에서 왔을 것이라는 정면으로 배치되었다. 미토콘드리아 DNA에 발생하는 돌연변이의 발생과 그 변화의 속도에 관련된 이러한 불확실성과 논란은 모든 관련 전문가들의 눈높이를 만족시킬 수 없기 때문에 미토콘드리아 DNA의 최초 조상의 나이에 대한 추산은 10만년 이하에서부터 거의 100만년전으로까지 광범위하였다. 미토콘드리아 DNA 염기서열로 수립된 계통발생학적 나무를 둘러싼 이러한 논란은 유전자 관점에서 보는 계통과 각 개체의 관점에서 보는 계통을 구별하지 않음에서 비롯된 것으로 다양한 인종의 미토콘드리아 DNA를 분석하여 얻어진 하나의 조상 염기서열 (미토콘드리아 이브)이 모든 현생 인류가 하나의 모체에서 나왔다는 것을 의미하는 것은 아니기 때문이다. 하나의 모체가 아니라면 현생 인류가 형성된 초기 인류의 규모는 어떠하였는가에 대한 의문은 여전히 남아있었다. 미토콘드리아 DNA의 계통발생학적 뿌리는 아프리카였을 가능성은 있지만, 초기 인류에서 병목현상의 존재 유무 및 존재한다면 그 규모, 생존한 여러 인류의 혼합에 따른 복합병목현상 등에 대한 의문이 남아있었다. 그래서 인류와 가까우면서도 더 조상적인 다른 종에 대한 연구도 시도되었다. (Ayala FJ, 1995, Gibbons A, 1992, Hasegawa M, et al, 1993, Scheffler IE, 2008)

2.2.3. 미토콘드리아 DNA와 계통발생학나무를 통한 인류의 기원 연구와 DB구축

여러 연구에 의해 진행된 미토콘드리아 DNA 염기서열 분석정보를 종합하여 분석한 결과 지구에 형성된 인류에 대한 가설을 다음과 같이 제시하였다. 10만에서 20만년전 무렵 아프리카에서 인류는 이주하기 시작하였고, 약 5만년 전에 한 군의 인류가 중동지역에서 다시 유럽 중부와 북부로 갈라져 나왔으며, 또 다른 군이 아시아 남쪽과 동남쪽으로 이동하였다. 또한 오래 전에 중국 지역에서 인도네시아

섬지역을 거쳐 뉴기니아, 호주로 이주하였다. 이 후 이 인구는 아시아 동쪽끝을 따라 북쪽으로 확장하여 베링해협을 거쳐 북미에 이르렀다. 이후 알래스카에서 남쪽으로 진행하여 북미, 중미, 남미로 확장하여 나갔다. 뉴기니아와 오스트레일리아 북쪽 주변의 섬에서 북태평양(폴리네시아, 하와이 등)으로 인구가 확장하여 이주한 것이 가장 최근의 인류의 역사로 보았다. 이러한 가설은 고인류학, 고고학, 비교언어학에서도 인류의 역사를 유사하게 설명하고 있어서 완전히 새로운 이론이라고 할 수는 없었으나 미토콘드리아 DNA 염기서열 분석정보는 좀더 상세하면서 확실한 근거를 제시할 수 있었다. 그리하여 인류의 계통발생학적 나무의 뿌리는 아프리카에 있다는 점은 어느 정도 과학적 합의가 이루어지게 되었다. (Scheffler IE, 2008, Redd AG, et al., 1995, Wallace DC, 1995)

인류의 기원에 대한 지역은 합의가 되었으나 미토콘드리아 DNA의 조상인 이브의 나이에 대해서는 여전히 논란이 분분하였다. 지구상의 여러 지역에서 발견된 화석에서 제시하는 근거(직립원인은 적어도 백만년 이전 존재)를 감안하였을 때 현생 인류가 탐지 가능한 유전적 교환이 없이 이전의 인종을 완전히 대체하였을 것이라는 유전학적 근거에 의거하여 인류의 기원을 설명할 수밖에 없을 것이다. 미토콘드리아 이브의 나이가 약 50만년 이상이라면 다지역발생설, 인체 유전자의 구성의 변화, 특이한 진화유형을 형성하도록 하는 선택적 압력 등 이러한 점들을 둘러싼 여러 가설이 제기될 수 있었다. 1995년에 기존에 알려진 분석 자료를 다시 철저히 재분석하였고 미토콘드리아 이브의 나이는 아마도 43만6천년에서 80만6천년 사이일 것으로 보았고, 이러한 추정치는 인간과 침팬지의 계통 사이에서 갈라지는 시간대를 추산하여 근거한 것이었다. 이후 미토콘드리아 DNA외에도 Y염색체, 상염색체 등 여러 인간 DNA 염기서열분석정보가 밝혀지면서 2006년 새로운 설명이 제시되었다. 인류의 역사는 크게 두 시대로 나뉘는데 첫 번째 시대는 약 2백만년 전에 나타났으며 현생 인류와 해부학적으로 유사하였다. 두 번째 시대는 아프리카에서 현생 인류가 출현하여 지구상의 각 지역으로 분포된다. 염기서열분석은 유전자 나무를 수립하는데 사용되었고 이 나무는 뉴클레오타이드 변이가 축적이 분자생물학적 시계가 될 수 있는 가정에 근거하여 가장 최근의 조상의 시간을 추산하는데 사용되었다. 이 분석결과를 종합하여 보았을 때, 인류의 조상은 50만년에서 80만년으로 추정되며 현생 인류 이전에 소멸된 네안데르탈인 등 여러 계통을 포함하는 것으로 단일기원설보다는

다지역기원설에 기울어지는 가설이었다. (Scheffler IE, 2008, Wills C, 1995).

이렇게 여러 인구에 대한 연구를 통해 확인된 미토콘드리아 DNA 염기서열과 다형태의 정보들을 등록하고 공용으로 이용할 수 있는 미토콘드리아 DNA 데이터베이스(<http://www.mtddb.igp.uu.se>)가 구축되어 있다. 이외에 이형세포질성에 대해 검출된 자료의 신뢰성을 확인해 볼 수 있는 mtDNA-Server (<http://mtdna-server.uibk.ac.at>) 등이 있다. (Jin HJ, et al., 2009, Lee HY, et al., 2006, Weissensteiner H, et al., 2016, 그림2 & 그림3 참조)

2.2.4. 미토콘드리아 DNA와 하플로그룹

하플로그룹에 대한 개념은 미주 원주민을 대상으로 한 미토콘드리아 DNA에 대한 연구에서 처음 제시되었다. 조절부위 염기서열을 분석한 결과 관찰된 변이의 양상에 따라 4개의 하플로그룹 (하플로그룹 A, B, C, D)으로 분류하였고, 이후 발견된 하플로그룹에 대하여 다른 알파벳을 사용하여 분류하였다. 1998년 서유럽의 여러 인종에 대한 미토콘드리아 DNA 조절부위와 암호부위 일부 특정부위를 바탕으로 분석결과 확인된 유전적 다양성을 하플로그룹으로 명명하는 법을 제시하였다. 그러나 이후 여러 연구들에 의해 이루어진 미토콘드리아 DNA 하플로그룹 명명이 일치하지 않는 경우가 있어서, 같은 하플로그룹을 다른 이름으로 명명하거나 서로 다른 하플로그룹이 같은 이름으로 명명되곤 하였다. 이러한 불일치는 모두가 합의할 수 있는 일반적이면서 체계적인 하플로그룹 분류시스템의 필요성이 대두되었다. (Richards MB, et al., 1998, Torroni A, et al., 1993, van Oven M, et al., 2009)

2009년 전세계 인류의 미토콘드리아 DNA 다양성을 보여주는 수많은 염기서열 변이들에 대해서 손쉽게 이용할 수 있도록 하기 위하여 관련 여러 문헌들을 검토 후 포괄적으로 종합하여 정리한 계통발생나무 및 하플로그룹 분류 시스템이 제시되었으며 이는 기존에 알려진 개정캠브리지 표준염기서열(rCRS)을 바탕으로 한 것이었다. 이후 이 개정캠브리지 표준염기서열은 유럽인의 하플로그룹의 하나인 H2a2a1에 속한 것임이 알려지면서 좀더 인류 미토콘드리아 DNA의 계통발생학적인 계보를 잘 보여줄 수 있는 개정된 인류표준염기서열 (Reconstructed Sapiens Reference Sequence)이 제시되었다. 다만 이를 실무에 바로 적용하기에는 아직 불완전하기 때문에 개정캠브리지

표준염기서열을 표준으로 사용하는 것이 권고되고 있다. 이러한 표준 염기서열을 바탕으로 여러 연구를 통하여 미토콘드리아 DNA 염기서열 전체에서 확인된 변이의 양상에 따라 계통발생학나무에 따른 다양한 군의 하플로그룹으로 분류하고 각 유형에는 영어알파벳과 숫자를 이용하여 명명하였다. 모든 하플로그룹은 계통별로 정리되어 “Phylotree” (www.phylotree.org)에 종합되어 있으며, 여러 연구를 통해 보고되는 새로운 변이를 지속적으로 갱신하여 반영하고 있다. (그림 3 참조) 또한 인류에 대한 진화인류학, 인류역사, 의학유전학, 유전계통학, 법의학 등의 연구를 위한 도구로 사용할 수 있기 위하여 구축된 것으로 주기적으로 갱신되고 있다. 또한 이 계통발생나무를 근간으로, 하플로그룹을 손쉽게 결정할 수 있는 온라인 분석 프로그램(MitoTool, <http://www.mitotool.org>, HaploGrep2, <http://haplogrep.uibk.ac.at>)이 개발되었다. 이러한 데이터베이스에 수록된 자료들을 근거로 하플로그룹을 결정할 수 있고, 이는 계통발생학적 의의 뿐만 아니라 법의학 개인식별영역에서 개체간 식별에 사용되는 과학적 근거가 되었다. 그 밖에도 하플로그룹으로 특징지어지는 다양한 변이의 특성은 미토콘드리아 기능에 영향을 주고 특정 질병과의 관련성이 있음이 알려지면서 하플로그룹의 분류는 개체식별 뿐만 아니라 질병의 연구에서도 중요한 의의가 있다. (Behar DM, et al., 2012, Hasegawa M, et al., 1993, Scheffler IE, 2008, van Oven M, et al., 2009, Samuels DC, et al., 2006, Stewart JB, et al., 2015, Weissensteiner H, et al., 2017a, Weissensteiner H, et al., 2016b, 그림3 참조)

2.3. 미토콘드리아 DNA의 법의학적 활용의 역사

2.3.1. 미토콘드리아 DNA를 이용한 개인식별의 실제적인 사례

1983년 코카서스인과 아프리카인을 대상으로 작은 규모로 선별하여 진행한 연구에서 미토콘드리아 DNA 조절부위 중 2곳의 과변이부위에 집중적으로 뉴클레오티드 변이가 몰려 있음이 발견되었고, 통계적 분석을 통해 개인식별에 적용하였다. 과학기술의 발전으로 사법절차와 인권보호를 위한 활동에 과학이 근사하면서도 감동적인 모습으로

접목되었던 계기는 1983년 아르헨티나 정부의 요청에 따른 미주인권위원회의 활동이었다. 아이들의 엄마들이 군사정권하에 희생되어 당시 생존한 아이들이 다른 곳으로 입양되었는데, 아르헨티나 법정에서는 이 아이들의 친자 관계가 과학적으로 증명될 수 있다면 헤어졌던 가족과 연결해주려고 하였다. 친부모가 없었던 상황에서 법적으로 친자관계를 증명할 수 있었던 방법은 모성유전인 미토콘드리아 DNA 염기서열분석을 통해 아이의 하플로그룹과 예상되는 외할머니 친족들의 하플로그룹과 비교하는 것이었다. 다만 이 방법이 과학적으로는 객관적이고 결정적이었지만, 여러 법적, 윤리적, 사회학적, 심리학적 쟁점들이 함께 부상하였다. (Anderson S, et al., 1981, Scheffler IE, 2008, Greenberg BD, et al., 1983)

2.3.2. 미토콘드리아 DNA를 이용한 개인식별과 이형세포질성

미토콘드리아 DNA 염기서열분석을 적용했던 또 하나의 놀라운 이야기는 러시아의 황제였던 니콜라스 II세와 그의 부인, 아이들, 그들의 종복들의 유해에 대한 진위여부에 대한 것이었다. 러시아의 황족들은 혁명기 동안 처형되어 예카테린부르크 근방에서 공동묘지에 묻혔다. 1991년 9구의 유골이 발견되었고 여기에 황제와 그의 황족들이 포함되어있는지 증명이 필요하였다. 뼈조직에서 미토콘드리아 조절부위의 염기서열이 확보되었기 때문에 그들의 생존해 있는 친척과 사망한 친척들과의 대조하였으며, 이때 미토콘드리아 DNA 조절부위의 점 이형세포질성에 대한 후속 연구들의 시발점이 되었다. 미토콘드리아 DNA 다형태라는 특징을 사법절차에 적용한다는 개념은 미국연방수사국과 군대가 각별한 관심을 보였다. 120이상의 가족을 대상으로 미토콘드리아 조절부위 염기서열을 분석하였고 이 결과로 인하여 “호발부위(hot spot)”의 가능성, 돌연변이 발생율과 진화의 속도 및 인류의 진화에 대한 논란이 가열되기도 하였다. (Scheffler IE, 2008)

2.3.3. 한국에서 미토콘드리아 DNA와 개인식별 연구

2002년 미토콘드리아 조절부위 염기서열이외에 암호부위 중 시토크롬 B 유전자의 다형태를 한국인에서 개인식별에 적용한 연구가 발표되었다.

이후 한국인에서 미토콘드리아 조절부위의 이형세포질성에 대한 연구, 한국인에서 나타나는 미토콘드리아 DNA 조절부위를 중심으로 다형성과 하플로그룹, 이형세포질성 양상을 파악하고자 하는 연구를 통해 한국인의 개인식별에 이를 활용하였다. (Choung CM, et al., 2005, Holland MM, et al., 1999, Hong SB, et al., 2014, Jin HJ, et al., 2009, Lee HY, et al., 2006, Lee SD, et al., 2002)

3. 법의학에서 미토콘드리아 DNA 최근 연구 동향

3.1. 법의학에서 미토콘드리아 DNA에 대한 기존 연구의 한계

3.1.1. 미토콘드리아 DNA분석의 한계: 제한적인 개체식별력

오래된 유골이나 머리카락처럼 세포핵 DNA가 변성되거나 분석이 불가능한 경우 미토콘드리아 DNA를 통해 모계와 비교분석, 미토콘드리아 DNA에서 확인되는 변이의 양상을 통해 결정된 하플로그룹으로 개체간 식별을 위한 추가적인 정보를 확보할 수 있는 점은 미토콘드리아 DNA 분석의 강점이었다. 그러나 이러한 강점은 동시에 약점이 되기도 하는데 세포핵 DNA만큼 강력한 개체식별력을 주지 못하기 때문이다. 특정지역의 인구내에서 하플로그룹의 분포는 비대칭적인 분포를 보이기 때문에 흔한 유형의 하플로그룹으로 결정되는 경우에는 개체식별의 한계에 부딪히게 된다. 예를 들면 코카시안 미국인을 대상으로 한 연구에서 약 20%의 개체가 인구의 0.5% 이상의 빈도를 가지는 미토콘드리아 DNA 하플로그룹을 가지고 있다고 하였다. 즉 동일 모계가 아님에도 우연히 같은 하플로그룹을 가질 가능성이 있으며, 이는 개체간 식별의 제한점이 되었다. (Coble MD, et al., 2004, Fendt L, et al., 2009, Holland MM, et al., 1999, Just RS, et al., 2015, Lee HY, et al., 2006, Lee SD, et al., 2002, Nilsson M, et al., 2008, Parsons TJ, et al., 2001)

3.1.2. 기존 미토콘드리아 DNA분석의 한계: 분석기법측면

미토콘드리아 DNA에 대한 기존의 연구와 실무는 생거의

염기서열분석기법이 주로 적용되었으며, 미토콘드리아 조절부위에서 변이가 자주 나타나는 과변이부위 및 암호부위 일부 특정부위가 실무적으로는 주 분석 대상이었다. 이는 연구 기법적인 면에서 시간, 비용과 인력의 소모를 최소화 할 수 있는 방법이었기 때문이었다. 개체간 식별력을 높이기 위하여 기존의 미토콘드리아 DNA 조절부위의 과변이부위를 벗어나 암호부위 등 다른 부위에서 관찰되는 변이를 포함하려는 연구가 우리나라를 포함하여 진행되었다. 이들 연구를 통하여 미토콘드리아 DNA 조절부위뿐만 아니라 암호부위에 대한 염기서열분석을 통해 식별력이 증가될 수 있음이 어느 정도 증명되었다. 2009년에는 이러한 제한점을 감안하여 조절부위와 암호부위 전체를 포함하는 전체염기서열분석을 수작업을 통해 높은 질의 결과를 보여줄 수 있는 방법을 제시하였었다. 다만 현실적으로 전체 염기서열분석은 여전히 비용효율적인 면에서 실무에 적용하기에는 어려운 상황이었다. (Coble MD, et al., 2004, Fendt L, et al., 2009, Holland MM, et al., 1999, Just RS, et al., 2015, Lee HY, et al., 2006, Lee SD, et al., 2002, Lutz-Bonengel S, et al., 2003, Nilsson M, et al., 2008, Parsons TJ, et al., 2001)

3.2. 차세대염기서열분석기법의 도입

3.2.1. 새로운 DNA 분석기법의 필요성 대두

1990년대에서부터 DNA 염기서열분석기법은 모세관 기반으로 반자동으로 수행되는 생거기법에 의해 수행되었다. 대량의 염기서열분석을 수행하는 경우 2가지 방식으로 분석한다. 첫째는 샷건염기서열분석기법(shotgun de novo sequencing)은 DNA를 무작위로 잘게 토막을 낸 후에 이를 대장균을 변화시킬 때 사용되는 플라스미드에 주입하여 많은 복제수로 복제시키고 플라스미드 DNA만을 추출하여 염기서열을 해독하는 방법이고 둘째는 해독하고 싶은 관심부위의 염기서열에 상보적으로 일치하는 길잡이를 통해 복제하여 염기서열을 해독하는 방법이다. 염기서열분석은 “주기 염기서열해독(cycle sequencing)” 반응으로 형성되며 각 주기에서는 DNA 주형의 변성, 길잡이 결합 및 연장 등이 일어나고, 길잡이는

관심부위에 상보적으로 결합하는 염기서열을 가지고 있다. 길잡이에서 염기서열이 연장될 때, 형광물질 표지자가 붙은 디디옥시뉴클레오티드가 확률적으로 결합하면, 염기서열의 연장은 중단되고, 각 DNA 토막은 중단된 부위에 표지자가 붙어있게 된다. 모세관 기반의 중합체 쉼에 이들 표지자가 붙어있는 DNA 토막들을 정주하면 고해상도 전기영동 방식으로 한가닥의 표지가 붙은 DNA로 분리가 되면서 염기서열을 해독할 수 있게 된다. 레이저를 통해 형광물질 표지자를 자극하면, 4가지 색깔을 추적하여 인지하고, 이를 컴퓨터 소프트웨어를 통해 추적한 결과를 염기서열로 해독한다. 다만 각 염기서열검출에는 오류가 있을 확률도 있다. 약 30년 동안 점진적인 기술개발로 생겨 기법은 1000개의 염기쌍까지 해독할 수 있으며, 염기서열검출의 정확도는 99.999%로 매우 높다. 대량의 염기서열을 분석할 수 있는 샷건 염기서열분석기법의 경우 매 1000염기쌍을 해독하는데 미화로 약 0.5불의 비용이 소모된다. (Lutz-Bonengel S, et al., 2003, Metzker ML, 2010, Schendure J, et al., 2008)

인간게놈프로젝트가 진행된 이후 기존의 DNA염기서열분석기법의 비용을 감소시킬 수 있는 적절한 다른 길이 거의 남아있지 않은 점, 인간과 주요 생명체의 전체 유전자의 표준서열이 있어서 이는 짧은 길이의 DNA 염기서열 해독이 잠재적으로 매우 유용할 수 있는 점, 분자생물학적 기법이 매우 다양하게 발전하면서 광범위한 생물학적 현상이 대량의 DNA 염기서열분석으로 평가되고 있다는 점, 마지막으로 현미경, 표면화학, 뉴클레오티드 생화학, 중합체 공학, 컴퓨터공학, 데이터 저장 및 기타 영역 등 서로 다른 영역에서 전반적으로 기술이 발달하면서, DNA 염기서열분석기법에 대한 대안기법이 실제적으로 사용될 수 있도록 기여하는 점 등 이러한 4가지 면에서 새로운 차세대염기서열분석기법의 필요성이 대두되었다. (Metzker ML, 2010, Schendure J, et al., 2008, Shendure J, et al., 2004)

3.2.2. 생겨 방법의 기술적 변화: 피로시퀀싱

차세대염기서열분석 중간 과도기 무렵에 기존의 생겨 방법을 변화시켜 개발된 방법이 있었다. 피로시퀀싱(pyrosequencing)이라고 하며, 전기영동으로 보여주기 전에는 방사성 또는 형광표지자가 붙은 뉴클레오티드 또는 올리고핵산염(oligonucleotides)을 사용하여 뉴클레오티드 서열을 추정할 수 없다는 점에서 기존의 방법과 다른

점이다. 피로인산염(pyrophosphate)이 합성되면 이 반응으로 빛을 발하는 현상을 이용하는 방법이 발견되어 이를 이용한 것이다. 이는 2개의 효소로 구성된 것으로 DNA 주형에 상보적 염기서열이 연장될 때 피로인산염이 방출되고, ATP sulfurylase가 이 피로인산염을 ATP로 변환시키고, 이는 루시페레이즈의 기질로 작용하여 피로인산염의 양에 따라 빛이 나오는 발광시스템을 적용하였다. 고체상에 부착된 DNA주형에 차례로 뉴클레오티드가 분주될 때마다 형성되는 피로인산염의 양에 따라 염기서열을 추정하게 된다. 이 방법 역시 기존의 생거 방법처럼 “sequence-by-synthesis”, 즉 적절한 결과를 얻기 위해서는 DNA 중합효소의 직접반응이 필요하다는 점에서는 다르지 않았지만, 디디옥시뉴클레오티드를 사용하지 않고 일반적인 뉴클레오티드를 사용해도 되는 간편한 점이 있고 전기영동이 필요 없이 실시간으로 관찰할 수 있다는 장점이 있었다. 후에 DNA 주형을 상자성 구(paramagnetic beads)에 부착시키고, 효소작용으로 변성된 뉴클레오티드를 제거하는 등 방법을 개선시켰다. 이 방법의 어려운 점은 같은 뉴클레오티드가 연속적으로 배열된 염기서열의 경우 몇 개까지 동일 뉴클레오티드인지 알아내는 것으로, 5개 이상인 경우 해독이 어려워진다는 것이었다. 이 방법이 더 진화되어 차세대염기서열기법의 첫 성공모델이 되었다. (Heather JM, et al., 2016)

3.2.3. 차세대염기서열분석기법의 탄생: 초병렬염기서열분석방식

454 (Life Science)는 기존의 인식체계의 변화를 가져온 염기서열분석기제로 염기서열분석반응을 초병렬로 수행하여 한 번의 분석으로 수행할 수 있는 DNA의 양을 증가시킬 수 있었다. 유도자(adapter)의 염기 상보결합을 통해 DNA를 구에 붙이고 이른 기름속에 물 형태의 유탁액 PCR을 진행시키면, 유탁액 안의 각 방울에는 이상적으로 한 종류의 DNA로 동일하게 복제된 상태로 구가 덮이게 된다. 이후 이를 세정하여 피로시퀀싱 방식으로 효소반응을 시키고 광전변환소자(charged couple device) 감지기를 통해 염기서열을 해독하게 된다. 이 방법은 보통 길이 400-500 염기쌍을 해독할 수 있었다. 대량의 DNA를 병렬식으로 염기서열분석을 미세수준에서 수행할 수 있다는 것은 미세수준의 제작과 고해상도 영상기술 덕택이었으며 이른바 제 2세대 DNA 염기서열분석기법 또는 차세대염기서열분석기법이 새로운 장을 열게 되었다. (Heather JM, et

al., 2016)

제2세대 염기서열분석기법은 몇 가지로 나눌 수 있는데, 미세전기영동방법, 부합화(hybridization)을 통해 염기서열을 해독하는 방법, 각 입자를 실시간으로 관찰하는 방법, 주기적인 배열(cyclic-array)로 염기서열을 해독하는 방법 등이 제시되었다. 주기적 배열 염기서열분석기법(cyclic-array sequencing)이 주로 여러 가지로 사용되었다. 이 기법은 샷건 염기서열분석과 주기적 배열방법을 결합한 기법이다. DNA를 무작위로 여러 토막으로 쪼갬 후에 동일한 염기서열의 유도자(adapter, 짧은 염기서열)와 DNA 토막들을 결합시켜 DNA 라이브러리를 준비시킨다. 복제된 엠프리콘들이 군집을 이룰 수 있도록 하기 위해서 in situ polonies (PCR colony), emulsion PCR, bridge PCR 등 여러 가지 프로토콜이 사용될 수 있다. “in situ polonies” 방식으로 진행시키는 경우 수백만의 공간적으로 움직일 수 없는 폴로니의 배열들이 나타난다. 각 폴로니에는 한 개의 샷건 DNA 토막의 많은 복제수가 있다. 한 번의 마이크로리터의 시약량(길잡이 결합 후 염기서열 연장반응)으로 모든 배열을 병행하여 다룰 수 있다. DNA형광물질 표지자를 인지하여 영상으로 변환하고 염기서열로 해독하며, 이 모든 과정은 병행적으로 이루어진다. ‘bridge PCR’은 유도자와 결합된 DNA를 ‘flow-cell’에 부착된 상보적 올리고핵산염에 정주하고 고체상 PCR을 수행하면 각 flow-cell에 결합한 DNA 주형으로부터 동일한 복제군집이 나타난다. 처음 결합했던 올리고핵산염에서 염기서열이 연장되어 바로 이웃한 올리고핵산염으로 연결되면서 고리모양으로 형성되기 때문에 “bridge”라고 명명되었다. 이 경우 DNA중합반응에 따른 염기서열연장은 생거방식을 이용하였다. 2005년에 이들 기법이 기존 방법에 비해 실용적이면서도 비용에서 효율적인 방법으로 기술하였다. 기존 생거방법에 비해 전반적인 장점으로는, DNA 라이브러리가 준비되고 이를 복제시킬 때, 기존 방법의 병렬진행을 막는 여러 병목현상을 피할 수 있는 점, DNA염기서열을 해독함에 있어 훨씬 더 높게 병행적으로 이루어지는 장점이 있는 점, 평면의 표면에 고정되어 있어서 한 번의 시약 주입으로 효소반응 관리가 가능하다는 점 등이 있었다. 사용되는 시료의 양을 줄일수 있었던 점이 비용을 극적으로 감소시키는데 결정적인 역할을 하였다. 그럼에도 여러 단점이 이러한 장점들을 상쇄시켰는데, 기존방법에 비해 해독할 수 있는 염기서열의 길이가 훨씬 짧고, 생거방식으로 알게 된 염기검출보다 10배 이상 정확도가 좋지 않았기

때문이었다. 이러한 제한점들은 곧 알고리즘으로 중요하게 해결해야 할 도전이 되었다. (Metzker ML, 2010, Schendure J, et al., 2008)

3.2.4. 차세대염기서열분석기법: Ion Torrent PGM 방식

여러 기술적인 혁신 속에서도 방사성이든, 형광이든, 발광시스템이든, 빛을 감지하여 영상을 통해 해독하는 점은 여전히 동일하였다. 이러한 개념을 탈피하여 인식체계의 변환을 가져온 혁신적인 기술이 개발되었는데, 이른바 “post-light sequencing’ 으로 불리기도 하는 2011년에 첫 선을 보인 Ion Torrent Personal Genome Machine (PGM)이다. DNA 염기서열분석결과를 특수 뉴클레오티드나 특수 시약을 사용하여 빛을 이용한 이미지로 보여주는 기존의 방식에 따른 한계를 극복하고 DNA 분자 그 자체를 그대로 인지하여 분석하는 염기서열분석기법을 개발하려는 시도 끝에 탄생한 기법이다. 신개발 직접회로를 적용하여 비시각적인 방법으로 염기서열분석결과를 보여주는 기법이었다. DNA 중합효소반응으로 뉴클레오티드가 결합하는 과정에서 수소이온이 방출되고, 이로 인해 pH가 변하게 된다. 시모스 반도체를 이용한 이온칩을 통하여 이러한 pH변화를 트랜지스터의 전위변화로 인지함으로써 염기서열분석이 가능하게 되며, 이를 통해 동시다발적으로 대량의 DNA 중합효소반응을 인지한다. 상보성 금속 산화막 반도체 즉 시모스 (Complementary metal-oxide-semiconductor; CMOS)라는 직접회로의 한 종류를 응용한 것으로, 널리 사용되는 기술을 채택함으로써 더 낮은 비용으로 대량의 정보를 더 빠르게 처리할 수 있도록 한 것이 이 분석기법의 장점으로 꼽힌다. DNA 처리방식은 피로시퀀싱과 유사하게 구에 동일하게 복제된 다수 DNA 토막들을 picowell에 세정시키면 각 뉴클레오티드가 결합하여 염기서열이 연장될 때 이를 피로인산염이 아닌 pH의 변화로 감지한다. 이 모든 과정은 작은 칩에서 일어나며 추가적인 광학장비 없이 바로 컴퓨터 소프트웨어에서 처리하여 결과를 보여줄 수 있게 되었다. 이러한 기술적인 새로운 변혁은 보편화된 기술을 도입하여 비용을 낮추면서도 염기서열 해독의 감지도를 높임으로 인간의 유전체 염기서열 해독을 보다 손쉽게 접근할 수 있게 해주었고, 미토콘드리아 DNA 염기서열분석에도 이 기법을 적용하기 시작하였다. (Quail MA, et al., 2012, Rothberg JM, et al., 2011)

3.3. 법의학에서 차세대염기서열분석기법을 적용한 미토콘드리아 DNA 최신 연구

3.3.1. 차세대염기서열분석기법을 적용한 미토콘드리아 DNA 염기서열분석기법의 입증과 수립

2013년 차세대염기서열분석기법인 Ion Torrent PGM을 적용하여 미토콘드리아 DNA의 전체 염기서열분석을 시도하고 이를 전통적인 방법인 생거 기법으로 분석한 결과를 비교분석함으로써, 실무영역에서 이 기법을 시도해 볼 수 있는 기틀을 마련하였다. 혈액, 파라핀 블록의 조직, 구강점막에서 면봉으로 채취한 시료 등 여러 시료를 대상으로 하였으며 생거 기법을 적용한 염기서열분석도 함께 시행하였으나 일부시료는 이전 발표자료를 일부 포함하였다. 과변이부위에 위치한 3곳의 C>T 부분, 이외의 결실, 치환, 점이형세포질성에 대해서 비교분석, 정렬 알고리즘으로 비교분석 등을 시행하였다. 분석결과 대부분의 염기서열이 일치함을 알 수 있었으며, 불일치로 보였던 염기서열분석결과도 염기서열분석과정의 정렬 알고리즘과 관련된 것으로 생각되었다. 이 연구결과는 차세대염기서열분석기법을 법의학 실무영역에서 적용하였을 때, 정렬 알고리즘의 개선, 데이터 분석과 해석에 대한 새로운 지침 등의 필요성을 제시하는 근거가 되었다. (Fendt L, et al., 2009, King JL, et al., 2014, Kong QP, et al., 2003, Parson W, et al., 2013, Seo SB, et al., 2015, Stoljarova M, et al., 2016, Templeton JE, et al., 2013, Zhou Y, et al., 2016)

3.3.2. 차세대염기서열분석기법에 의한 다양한 인종에서의 미토콘드리아 DNA 전체염기서열분석 및 유전적 다양성 연구

이후 차세대염기서열분석기법을 적용하여 여러 인종에서 나타나는 미토콘드리아 DNA 전체 염기서열을 해독하여 분석한 연구들이 뒤를 이었다. 2014년 미국의 코카시안, 히스패닉, 아프리카 미국인을 대상으로 미토콘드리아 DNA 전체염기서열 분석 및 하플로그룹에 대해 보고되었으나, 이는 기존 생거 방식을 따른 것이었다. 2015년 에스토니아 인종에 대하여 차세대염기서열분석기법을 적용하여 미토콘드리아 전체염기서열분석을 시행하였으며 분석결과, 기존의

미토콘드리아 조절부위 과변위부위로만 하면 95.85%의 유전적 다양성을 보여주지만, 전체염기서열을 분석하여 보면 99.675%의 유전적 다양성을 보여주었다고 하였다. 2015년 모발 일부분이나 빠진 모발처럼 털집이 없는 모발에서 미토콘드리아 DNA 정보를 얻기 위해 초병렬염기서열분석기법을 이용하여 전체염기서열분석 결과를 얻어내어 법의학업무에서 차세대염기서열분석의 유용성을 증명하였다. (Fendt L, et al., 2009, King JL, et al., 2014, Kong QP, et al., 2003, Parson W, et al., 2013, Seo SB, et al., 2015, Stoljarova M, et al., 2016, Templeton JE, et al., 2013, Zhou Y, et al., 2016)

3.3.3. 미토콘드리아 DNA 전체염기서열 분석도구의 변화

미토콘드리아 DNA 분석에 차세대염기서열분석기법의 도입으로 전체염기서열에 더 쉽게 접근할 수 있게 되었으나 그 결과 얻어진 막대한 양의 정보의 처리, 민감도가 높아지면서 실제 돌연변이와 염기서열분석과정의 인공산물을 구분하는 등의 해석 등 기존과는 다른 분석도구의 필요성이 대두되었다. 차세대염기서열분석기법을 통해 얻어진 염기서열정보를 입력하면 자동화된 온라인 프로그램에서 분석하여 결과를 제시해주는 “MitoTool”, “HaploGrep” 등의 분석도구가 탄생하였다. 개정캠브리지표준염기서열(rCRS), 개정인류표준염기서열(RSRS)에 따른 계통발생학적 분류에 따라 분류된 하플로그룹에 대한 결과가 제시된다. “MitoTool”은 생물정보학에 근거한 분석도구로, 계통발생나무에 따라 하플로그룹을 결정할 때 각 하플로그룹을 결정하는 주요변이와 분석하고자 하는 시료에서 나타나는 변이들의 공통점과 차이점을 분석하여 점수를 주는 방식으로 접근한다. “HaploGrep”은 하플로그룹을 결정하는데 가장 정확한 알고리즘으로 분석하는 것으로 알려져 있으며, “MitoTool”과의 차이점은 “HaploGrep”은 각 변이에 대하여 계통발생학적으로 얼마나 자주 나타나는가 하는 빈도를 근거로 가중치를 부여하여 분석하고, “MitoTool”은 이런 가중치를 부여하는 점이 없는 것이 차이이다. 따라서 개별변이(private variant)가 있는 경우 가중치 부여에 따른 영향으로 그 의의가 무시되거나 또는 더해질 수 있는 치우침(bias)이 있을 수 있다는 의견도 제시되었다. 또한 차세대염기서열분석기법의 특성상 적은 양의 DNA 염기서열분석도 가능해짐에 따라

이형세포질성의 결정과 해석이 더 복잡해졌다. 그리하여 이형세포질성 분석만을 위한 웹분석도구가 개발되었는데 바로 “mtDNA-Server”이다. 차세대염기서열분석결과를 입력하여, 분석결과와 질을 평가한 후에, rCRS에서 변이 호발부위(hot spot; 309, 315, 3107 등), 10 미만의 낮은 coverage를 보이는 부위를 포함시키지 않으며, 여러 알고리즘을 통해 분석하고 NUMT(세포핵내 미토콘드리아 염기서열)에 대해서 분석하고, 시료간 오염의 가능성도 검토할 수 있게 되었다. (Fan L, et al., 2013, Weissensteiner H, et al., 2016)

3.4. 동아시아 인종 및 한국인의 미토콘드리아 DNA 대한 연구

2002년 중국 한족에 대한 미토콘드리아 DNA를 분석하여 계통지리적인 분석을 시도하였다. 중국 한족은 세계에서 가장 큰 인종으로 전체 지구 인구의 20%를 차지한다. 이전에도 중국인에 대한 연구가 있었고, 같은 해 중국 남쪽 지역의 69명의 중국인을 대상으로 미토콘드리아 전체 염기서열분석을 한 다른 연구가 있기는 하였으나, 중국 대륙 전체 인구와 분포를 고려하였을 때, 시료선별이 제한적이라고 보아 중국의 6개 지역에서 263명을 선별하여 이들의 미토콘드리아 DNA 조절부위의 과변이부위 염기서열을 분석하였다. 각 지역별로 나타난 하플로그룹은 달랐으며, 확인된 하플로그룹으로는 M7b1, M7b2, M7b, M7c, M7, M8a, C, Z, M9, M10, M, N, M/N, G2, D, D4a, D4b, D4, D5a, D5, A, N9a, Y, B4a, B4b, B4, B5a, B5b, B5, B, R9a, R, F1a, F1b, F1c, F2a, F2, F 등이 있었고 일부 서유럽 인종으로 알려진 하플로그룹도 있었다고 하였다. (Kivisild T, et al., 2002, Underhill PA, et al. 2007, Yao YG, et al., 2002)

다음해인 2003년에는 한족 이외에 중국 북쪽지방에 거주하는 5군의 인종(다우르족, 에벤키족, 조선족, 몽고, 어룬춘족)의 미토콘드리아 DNA 조절부위의 과변이부위와 암호부위 일부 대하여 염기서열분석을 시행하였다. 각 인종에 따라 공통적으로 보이는 하플로그룹 (D, D5, A)도 있었지만 대부분은 각 인종에 따라 다른 유형을 보였다. 이주한 한국인으로 생각되는 조선족의 경우 공통 유형 이외에 하플로그룹 A5, G2, G2a, Z, M10, M7b2, B4b, B5b, G1a, G3, M7a1, M7c, M, N9a, B4 등이 있었다고 하였다. (Kong QP, et al., 2003)

이렇게 발표된 여러 연구에서 일부 새로 정의된 하플로그룹을

반영하여 제시한 동아시아 계통발생학적 나무가 만약 미토콘드리아 DNA 전체염기서열분석결과에 부합할 만큼 신뢰할만 하고 동아시아의 미토콘드리아 DNA의 가계의 관계를 완전히 반영하는지에 대한 의문이 제기되었다. 같은 해 중국 전역에서 시행된 2000여개 이상의 샘플 중에서 서로 다른 하위 하플로그룹을 지닌 48개의 시료를 선택하여 전체염기서열분석을 시행하였다. 하플로그룹 D, M7, C, A, N9a, M, R, N 등은 부합한 결과를 보여주었다. 하플로그룹 D5, G1, G2, M7b, M7c, M8, M8a, Z, M9a, M10, F1, F1a, F1c, F2, B4c, B5, B5a, B5b 등은 추가적인 변이로 유형결정이 가능하였고, 일부 하플로그룹은 이 연구를 통해 재정의되었다. (Parson W, et al., 2015)

2004년 672명의 일본인을 대상으로 전체염기서열분석을 시행하여 이에 대하여 계통발생학적 분석을 하였다. 이때의 하플로그룹 유형 결정은 초기 분류에 따른 것으로, 미토콘드리아 DNA염기서열분석을 통해 일본인은 대륙 아시아에서 이주하여 왔을 것이라고 제안하였다. 하플로그룹 A1, N9a이 가장 흔한 빈도를 보이며, 이외 확인된 하플로그룹으로 F1b, B5b2, A1a, N9b, F1a1, B4c1, M/N, B, B5b1, HV, B4a, B4a1, B4, B4c1b, B5a1, B4b, B5b, B4f, F, A1b1, F1a, R9a B5b3 등이 있었다. (Tanaka M, et al., 2004)

미토콘드리아 DNA 전체염기서열을 분석한 연구보다는 조절부위와 암호부위 일부 부위를 적용한 연구들이 진행되어 왔었다. 2002년 미토콘드리아 조절부위 이외의 부위 이외에 다형성이 많은 부위로 시토크롬B 유전자를 적용하여 개인식별력을 개선하려는 연구가 있었다. 암호부위의 특정부위에 해당하는 시토크롬B 유전자의 다양성은 조절부위 염기서열이 동일한 것으로 여겨졌던 개체군에서 세부 식별이 가능함이 증명된 연구였다. (van Oven M, et al., 2009, Bandelt HJ, et al., 2001)

2006년 593명의 한국인을 대상으로 미토콘드리아 DNA 조절부위 염기서열 분석을 하였고 확인된 여러 변이에 대한 데이터베이스가 구축되었다. 한국인에서 나타난 하플로그룹에는 D4, D4a, D4b, D4b1, D4b2, D5, D5a, d5b, D, G1a, G1b, G2a1, G2a1a, G2a2, G3a, M7a, M7a1, M7b1, M7b2, M7c, M7c1, M8, CZ, C, Z, M8a, M9a, M10, M11, M, F F1, F1ac, F1a, F1ac, F1a, F1c, F1b, F2a, R11, B4, B4a, B4b1, B5a, B5b, A, A4, A5, N9a, N9a1, N9a2, N9b, Y, Y1, ND 등으로 알려졌고, 이중 가장 흔한 하플로그룹 유형은 D4, D4a, B4, B4a, M7b2 등이었다. 같은 해 대부분의 한국인의 미토콘드리아 DNA 조절부위에는

동아시아에서 나타나는 여러 하플로그룹을 결정하는 중요한 변이들을 공유하고, 세부 하플로그룹을 결정하기 위해서는 암호부위의 변이가 필요하다는 점에서 암호부위 변이 중 선별한 단일염기다형성 표지자를 이용하여 하플로그룹 결정의 정확성을 높임으로 개체식별력을 높이기 위한 연구였다. (Lee HY, et al., 2006, Lee HY, et al., 2006)

2009년 한국인에 대하여 계통발생학적 접근을 하는 연구가 있었다. 한국인, 조선족, 몽고, 만주족, 한족, 베트남인, 태국인 등 동아시아의 7곳의 인종에 대하여 미토콘드리아 DNA 조절부위 과변이부위, 암호부위 염기서열 중 하플로그룹 유형결정에 특이적인 변이, Y 염색체 변이에 대하여 분석하였다. 일반적으로 한국인의 미토콘드리아 DNA는 하플로그룹의 분포를 분석해 보았을 때 동북아시아 인종과 유사하였고, 일부 남아시아 인종이 변이형성에 기여하였을 것으로 보았다. (Jin HJ, et al., 2009)

4. 연구의 필요성

미토콘드리아 DNA의 염기서열 해독 및 분석은 유전적 다양성에 대해 파악할 수 있을 뿐만 아니라 법의학의 개인식별 영역에서 기초자료가 된다는 점에서 매우 중요하고 필요하다. 최근의 과학기술의 발달로 탄생한 차세대염기서열분석기법과 같은 신기술은 미토콘드리아 DNA 전체염기서열분석을 손쉽게 하였고, 법의학 개인식별 영역에서도 적용할 수 있음이 증명이 되었다. 또한 여러 인종에서 미토콘드리아 DNA 전체 염기서열 분석결과 및 각 인종별 유전적 다양성에 대한 연구가 진행되었고, 아프리카인, 미국인, 코카시안 미국인, 히스패닉 미국인, 에스토니아인 인종에서 미토콘드리아 DNA 전체염기서열분석에 따른 유전적 다양성을 파악하기 위한 다양한 연구들이 진행되고 있다. 그러나 한국의 경우, 법의학 실무영역에서 한국인에 대한 개인식별을 위해서는 한국인에서 나타나는 미토콘드리아 DNA의 염기서열분석자료 및 유전적 다양성에 대한 정보가 필요하지만, 대부분 미토콘드리아 DNA 조절부위 또는 조절부위의 과변이부위, 암호부위의 특정부위에 국한되어 있고, 전체 염기서열에 대한 정보가 매우 제한적인 상황이다. (Allard MW, et al., 2004, Jin HJ, et al., 2006, Jin HJ, et al., 2009, Lee HY, et al., 2006) 따라서 한국인에서 나타나는 미토콘드리아 DNA 전체

염기서열에 대한 분석 및 그에 따른 유전적 다양성에 대한 연구가 필요하다고 보았다.

목적

1. 한국인에서 차세대염기서열분석기법을 이용하여 미토콘드리아 DNA 전체염기서열을 해독하고 변이에 대하여 분석한다.
2. 한국인에서 나타나는 미토콘드리아 DNA의 변이의 양상을 분석하고, 다른 민족에 대한 연구를 통해 한국인의 유전적 다양성에 대하여 분석한다.
3. 한국인의 미토콘드리아 DNA 전체염기서열분석결과 결정된 하플로그룹과 하플로타입의 양상을 분석하고, 다른 민족에 대한 연구를 통해 한국인의 유전적 다양성에 대하여 분석한다.
4. 한국인의 미토콘드리아 DNA 전체염기서열분석결과 나타나는 점이형세포질성의 양상을 파악하고 다른 민족에 대한 연구를 통해 한국의 유전적 다양성에 대해 분석한다.
5. 한국인에서 미토콘드리아 DNA의 조절부위의 염기서열 분석결과와 전체염기서열 분석결과를 비교하여 전체염기서열분석, 개체식별력 등의 의의를 알아본다.

재료와 방법

1. 시료

한국인의 미토콘드리아 DNA 조절부위/과변이부위에 대한 연구 결과 알려진 모든 하플로그룹을 연구대상으로 고려하기에는 현실적으로 제한이 있었다. 따라서 6·25 한국전쟁과 제주43사건 관련 유전자 감식사업에서 확보된 것으로 모두 유전자 검사에 대한 법적 동의서가 있는 한국인 시료 중에서, 계통발생학적으로 분류되는 양상을 고려하여, 이전 연구보고자료와 공용 mtDNA 데이터베이스 (Jin HJ, et al., 2009, Lee HY, et al., 2006, <http://www.mtddb.igp.uu.se>)를 바탕으로 한국인에서 흔하게 나타나는 것으로 알려진 하플로그룹에 따라 186명의 한국인 시료를 선별하였다. 하플로그룹 결정은 미토콘드리아 DNA 조절부위의 과변이부위 염기서열분석결과 확인된 변이의 양상에 근거한 것이었다. 각 시료는 일부 시료에서 지역적 및 성별에 대한 정보를 알 수 있었고, 선별된 시료 간의 친족관계 여부, 병력에 대한 정보는 알 수 없었다. (표 1과 표2 참조, 그림3과 그림4, 그림5 참조).

매크로하플로그룹 D (macrohaplogroup D)는 한국인에서 가장 흔한 하플로그룹으로, 미토콘드리아 DNA 조절부위 염기서열에서 확인되는 변이 양상만으로는 하위 하플로그룹을 결정하기에는 제한적이었다 (Allard MW, et al., 2004, Jin HJ, et al., 2009, Lee HY, et al., 2006), 이에 따라 하플로그룹 D4a, D4a3, D4b1, D5b (Haplogroup D4a, D4a3, D4b1, D5b)를 선별하였다. 하플로그룹 A, M7, F, G, B4, N9a 역시 한국인에서 흔히 나타나는 유형으로 (Allard MW, et al., 2004, Jin HJ, et al., 2009, Tanaka M, et al., 2004, Kivisild T, et al., 2002, Underhill PA, et al., 2007), 하플로그룹 A5a, M7a1, M7b1, F1b1, G1a1, B4a, B4c1c, N9a2a를 선별하였다. 매크로하플로그룹 M9, G, D는 미토콘드리아 DNA 조절부위의 16223, 16362, 489번 뉴클레오티드 위치에서 공통적으로 변이를 가지고 있는 것이 특징이기 때문에 조절부위에서 확인되는 변이 양상만으로는 하위 하플로그룹을 결정하기에 제한적이고 암호부위에서의 정보가 필요할 것으로 보아 (Jin HJ, et al., 2006, Lee HY, et al., 2006, Maruyama S, et al., 2013, 그림3), 이 군에서 선별하였다. 추가적으로 제주도는 한국 본토와 다른

유전적 특성을 가진 것으로 알려져 있고 (Allard MW, et al., 2004), 하플로그룹 Y가 흔히 나타나는 것으로 알려져 있어서 세부 하플로그룹으로 분류가 가능한지 알아보기 위하여 이 군을 포함하여 선별하였다.

2. 미토콘드리아 DNA 추출과 증폭

모든 시료는 냉동 보관된 혈액이었으며, 이들을 해동한 후 Maxwell® 16 Blood DNA Purification Kit (Promega, Madison, WI, USA)와 Maxwell® 16 instrument (Promega)을 이용하여 DNA를 추출하였다. DNA 증폭에 사용할 길잡이(primer)는 미토콘드리아 DNA 전체를 포함하는 두 개의 앰플리콘(amplicon)이 생성되도록 구성하였으며, 길잡이의 염기서열은 기존에 보고된 연구결과(Fendt L, et al., 2009, Gonder MK, et al., 2007)를 따랐다. (표 3 참조) 미토콘드리아 DNA를 차세대염기서열분석법에 적용하는 과정에서 이 방법을 사용할 경우 검출된 염기서열의 질과 정확도를 높이는 것으로 알려져 있다. 각 앰플리콘의 중합효소연쇄반응에는 TaKaRa LA Taq DNA polymerase (Takara Bio Inc., Otsu, Shiga, Japan)를 사용하였으며, 각 반응의 결과물은 HiYield™ Gel/PCR DNA mini Kit (Real Biotech Corporation, Taipei, Taiwan)로 정제하였다. 이들은 NanoDrop 2000 spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)로 정량한 뒤 각 앰플리콘의 농도가 50 ng/ μ l이 되도록 희석하였으며, 각 20 μ l씩 같은 양을 혼합하여 다음 단계의 실험에 사용하였다. 모든 실험장비와 키트는 각 제조사에서 제공한 사용방법에 따라 적용하였다.

3. 라이브러리 준비와 초병렬염기서열분석

앞서 준비된 시료들에 대하여, Ion Xpress™ Plus Fragment Library Kit (Thermo Fisher Scientific)를 사용하여 분절된 라이브러리(library)를 제작하였으며, DNA shearing은 kit에 포함된 'Ion Shear™ reaction을 이용한 효소에 의한 DNA 분절화 방법을

사용하였다. 각 라이브러리에 Ion Xpress Barcode Adapters Kit (Thermo Fisher Scientific)를 이용해 표지자를 바코딩하였다. 이들을 Ion Library Quantitation Kit (Thermo Fisher Scientific)을 이용하여 정량한 뒤 각각의 농도가 26 pM이 되도록 희석하였다. 이들은 미세구슬(microbead)에 결합되어 중합효소연쇄반응을 거친 뒤 PGM (personal genome machine)에서 염기서열분석이 시행되었다. PGM은 시료를 주입한 반도체칩을 염기서열분석에 사용하는데, 이 실험에서는 각각 16개의 시료를 올린 Ion 316 chip (Thermo Fisher Scientific)을 사용하였으며, 각 시료 세트에는 대조검체인 SRM2392 (9947A)이 포함되어 있었다. (그림6 참조) 모든 장비와 키트는 제조사인 Thermo Fisher Scientific의 가이드라인에 따라 사용되었다.

4. 자료분석

실험을 통해 얻은 염기서열자료는 Ion Torrent Suite Software (Thermo Fisher Scientific)를 사용하여 분석하였다. 기준 염기서열로는 rCRS (the revised Cambridge Reference Sequence)가 사용되었으며, 이에 대한 변이 분석을 위하여 위 프로그램에서 제공하는 Variant Caller Plugin (Thermo Fisher Scientific)이 사용되었으며, 분석결과는 Variant Caller Format (VCF) 보고서로 제공되었다. 이와 더불어, Integrative Genomics Viewer (IGV)를 사용하여 VCF 보고서에서 제외되었거나 잘못 검출된 변이들을 시각적으로 재확인하였다.

하플로그룹은 PhyloTree Build 16 database (Behar DM, et al., 2012, van oven M, et al., 2009)를 바탕으로, MitoTool (<http://www.mitotool.org>)과 HaploGrep2 (Weissensteiner H, et al., 2016; <http://haplogrep.uibk.ac.at>)을 이용하여 결정하였다.

위에서 얻은 염기서열의 변이와 하플로그룹 분석 결과는 BAM 형태의 원자료를 mtDNA-Server (Weissensteiner H, et al., 2016; <http://mtdna-server.uibk.ac.at>)를 통해 분석함으로써 다시 한 번 검증하였다.

5. 윤리적 선언

본 연구는 서울대학교병원 의생명연구원의 의학연구윤리심의위원회에 의해 승인을 받았으며, 사전동의를 받았음을 확인받았다. 또한 모든 시료는 유전자 검사에 대하여 법적 동의서를 받은 것이었다.

연구결과

1. 미토콘드리아 DNA 염기서열분석에서 coverage

1.1 염기서열분석과 coverage

염기서열분석에서 coverage란 해당 DNA 염기서열을 몇 번 해독했는지를 평균적인 수치로 표현하는 것으로, 알고 있는 표준 염기서열에 맞추어 정렬한 대로 해독한다는 의미로서 “cover”에서 유래하였다. 차세대염기서열분석기법의 특성상 특정 염기서열위치에서 특정 변이가 확인되었다는 신뢰할 만한 염기 검출(base call) 결과를 얻기 위해서는 여러 번의 해독이 필요하고, 해독이 모든 염기서열부위에서 동일한 횟수로 일어나는 것이 아니라 부위에 따라 달라질 수 있기 때문에 이를 확인하는 것은 중요하다.

1.2 염기서열부위와 coverage

본 연구에서 선별된 모든 186명의 시료에서 미토콘드리아 DNA 전체염기서열의 coverage는 평균적으로 1,200배였다. 선별된 모든 개체의 미토콘드리아 DNA를 해독하였을 때, 2,600번째 뉴클레오티드가 위치한 부위 부근의 크기 300 염기쌍 이하의 염기서열부위에서 8,000배에 이르는 유달리 높은 coverage를 보여주었다. 대조적으로 13,600번째 뉴클레오티드와 14,800번째 뉴클레오티드 사이에 존재하는 염기서열 부위에서는 500배 이하의 낮은 coverage를 보였다.

2. 미토콘드리아 DNA 전체염기서열에서 변이

2.1 변이검출 및 불일치 해석

차세대염기서열분석기법을 적용하여 얻은 분석결과를 그래프 뷰어를 사용하여 확인하였다. 이는 차세대염기서열분석결과에 대하여 이해하고

염기서열분석 중 잡음을 구분할 뿐만 아니라 변이 검출의 불일치를 해석하는데 유용하였다. (Parson W, et al., 2013)

변이검출형식보고서(Variant caller format; VCF)에서 보고된 변이는 Integrative Genomics Viewer (IGV)와 mtDNA-server를 통해 전체염기서열을 수작업으로 일일이 다시 확인하였다. (Weissensteiner H, et al., 2016) 이를 통해 IGV에서 검출되지 않았거나 오검출된 변이의 유무를 확인할 수 있었다. (표 4, 표 5 참조)

2.2 보고되지 않은 변이 오류

VCF에 보고되지는 않았으나 기존에 가지고 있었던 생거방식을 통한 조절부위 염기서열분석자료로 변이의 유무를 확인할 수 있었으며 그 결과는 다음과 같았다.

■ 71번째 뉴클레오티드 위치

변이로 검출되지 않았으나, 실제 염기서열에서는 이 위치에 뉴클레오티드(구아닌)가 추가로 삽입된 변이(71.1G)가 확인되었다. 하플로그룹 B4a군(B4a1c1a, B4a1c1a1)에 해당하는 3명의 개체에서 이 변이가 확인되었다.

■ 455번째 뉴클레오티드 위치

변이로 검출되지 않았으나, 실제 염기서열에서는 이 위치에 뉴클레오티드(티민)가 추가로 삽입된 변이(455.1T)가 확인되었다. 하플로그룹 D4(D4a, D4d)에 해당하는 3명의 개체에서 이 변이가 확인되었다.

■ 573번째 뉴클레오티드 위치

변이로 검출되지 않았으나, 실제 염기서열에서는 이 위치에 뉴클레오티드(시토신)가 추가로 삽입된 변이(573.1C)가 확인되었다. 하플로그룹 A5a(A5a3)에 해당하는 1명의 개체, 하플로그룹 M9;G;D군(D4e2a)에 해당하는 2명의 개체에서 이 변이가 확인되었다.

IGV에서 확인된 변이 역시 VCF에 보고되지 않아서 위음성 오류로 확인된 변이는 다음과 같았다.

■ 960번째 뉴클레오티드 위치

변이로 검출되지 않았으나, 실제 염기서열에서는 이 위치에 뉴클레오티드(시토신)가 추가로 삽입된 변이(960.1C)가 확인되었다. 하플로그룹 N(N9a2a)에 해당하는 11명의 개체에서 이 변이가 확인되었다.

■ 16182번째와 16183번째 뉴클레오티드 위치: 변이로 검출되지 않았으나, 실제 염기서열에서는 이 위치에 뉴클레오티드(아데노신 → 시토신)가 치환된 변이(16182C, 16183C)가 확인되었다. 하플로그룹 B4군에 해당하는 전체 20명의 개체, 하플로그룹 F1b1군에 해당하는 전체 16명의 개체, 하플로그룹 M7b군(M7b1a1a1)에 해당하는 1명의 개체에서 이 변이가 확인되었다. 하플로그룹 M7b군(M7b1a1a1)에 해당하는 다른 1명의 개체, 하플로그룹 D군(D5b)에 해당하는 2명의 개체에서 16183번의 변이만 관찰되었다.

2.3 삽입-결실과 관련된 정렬 오류

삽입-결실과 관련된 정렬 오류(Indel-related alignment errors)에서도 VCF에서 보여진 결과와 실제 염기서열을 확인하였을 때의 결과에 다음과 같은 차이가 있었다.

■ 249번째 뉴클레오티드 위치의 결실변이

247번째 뉴클레오티드 위치에 결실이 있는 변이로 검출(247GA → 247G)되었으나, 실제 염기서열을 확인하였을 때 249번째 뉴클레오티드(아데노신)가 결실된 변이(249del)였다. 이 변이는 하플로그룹 F1b1군 전체 16명의 개체에서 확인되었다.

■ 523-524번째 뉴클레오티드 위치의 결실변이

513번째 뉴클레오티드와 이웃한 뉴클레오티드 2곳에서 결실이 있는 변이로 검출(513GCA → 513G)되었으나, 실제 염기서열을 확인하였을 때 523번째와 524번째 뉴클레오티드(각각 아데노신, 시토신)가 결실된 변이(523-524del)였다. 이 변이는 하플로그룹 A5a 전체 20명의 개체, 하플로그룹 B4a 전체 16명의 개체, 하플로그룹 D4b와 M9;G;D(D4b1, D4b2a2, D4d)에 해당하는 11명의 개체, 하플로그룹 F1b1 전체

16명의 개체, 하플로그룹 G1a1에 해당하는 1명의 개체, 하플로그룹 M7a1 전체 9명의 개체에서 확인되었다.

■ 2,156번째 뉴클레오타이드 위치 삽입 변이

2,150번째 뉴클레오타이드에 추가로 뉴클레오타이드(아데노신)가 삽입된 변이로 검출(2150T → 2150TA)되었으나, 실제 염기서열을 확인하였을 때 2,159번째에 추가로 뉴클레오타이드(아데노신)가 삽입된 변이(2156.1A)였다. 이 변이는 하플로그룹 A5a 전체 20명의 개체에서 확인되었다.

■ 5,899번째 뉴클레오타이드 위치 삽입변이

5,894번째 뉴클레오타이드 위치에서 삽입된 변이(5894A → 5894AC)로 검출되었으나, 실제 염기서열을 확인하였을 때 5,899번째에 뉴클레오타이드(시토신)가 삽입된 변이(5899.1C)였다. 이 변이는 하플로그룹 M7a1 전체 9명의 개체에서 확인되었다.

■ 8,281-8,289번째 뉴클레오타이드 위치 결실변이

8,270번째 뉴클레오타이드 위치에서 여러 개의 뉴클레오타이드가 결실된 변이(8270CACCCCCTCT→ 8270C)로 검출되었으나, 실제 염기서열을 확인하였을 때 8,281번째에서 8,289번째 사이에 위치하는 뉴클레오타이드(CCCCCTCTA)가 결실된 변이(8281-8289del)로 확인되었다. 이 변이는 하플로그룹 B군(B4a, B4c) 전체 20명의 개체에서 확인되었다.

poly-tracts나 삽입-결실로 인한 오정렬에 따른 혼합결과는 mtDNA server를 통해 확인하였었다. 이러한 불일치는 이 위치 부근에 poly C tract나 poly A tract으로 인한 정렬오류에 의한 것이었다. (Zhou Y, et al., 2016)

■ 4,248번째 뉴클레오타이드 위치 치환변이

4,246번째 뉴클레오타이드 부근의 염기서열이 혼합결과(4246ATT → AT,ATC)로 검출되었으나, 실제 염기서열을 확인하였을 때 4,248번째에 뉴클레오타이드(아데노신 → 시토신)가 치환된 변이(4248C)였다. 이 변이는 하플로그룹 A5a 전체 20명의 개체에서 확인되었다.

■ 9,540번째 뉴클레오티드 위치 변이

9,540번째 뉴클레오티드 부근의 염기서열이 혼합결과(9540C 또는 9540T/C)로 검출되었으나, 실제 염기서열을 확인하였을 때 9,540번째 뉴클레오티드(티민 → 시토신)으로 치환된 변이(9540C)였다. 이 변이는 하플로그룹 D4군에 해당되는 11명의 개체에서 확인되었다.

2.4 기타 변이

5명의 시료에서 확인된 2,478번 뉴클레오티드 위치, 20명의 시료에서 확인된 10,838번 뉴클레오티드 위치는 IGV를 사용하였을 때 혼합부위로 관찰되었으나, mtDNA-server에서는 그렇지 않았다. 이러한 소견들은 특히 하플로그룹에서 이들 부위 부근에 polymeric tracts가 결여되어 생긴 인공산물 때문인 것으로 추정되었다.

9,824번 뉴클레오티드 위치에서 3개의 대립형질(tri-allele)변이가 확인되었다. 이들은 하플로그룹 M7에서 시토신 전이(transition), 하플로그룹 M9;G;D에서 아데노신 전이(transition)였다.

2.5 동형세포질성 변이

186명의 한국인시료에서 총 6,495 변이가 관찰되었다. 이중 159개의 변이는 삽입결실(2.45%)이고 나머지 6,336개의 변이(97.55%)는 치환에 의한 변이였다. 미토콘드리아 DNA 전체 염기서열에서 확인되는 동형세포질성 변이들을 조절부위와 암호부위에 따라 나타나는 변이의 양상을 분석해보았다. 동형세포질성 변이들은 암호부위에서 더 높은 빈도로 발견되었으며, 평균적으로 암호부위에서 74.10%, 조절부위에서 25.90%였다. (표 6 참조)

■ 하플로그룹 D4

모두 1,998개의 변이가 관찰되었으며, 조절부위에서 446개(22.32%), 암호부위에서 1,552개(77.68%)로, 조절부위의 변이의 개수에 대하여 암호부위의 변이의 개수의 비율은 3.48로 나타났다.

■ 하플로그룹 A5a

모두 611개의 변이가 관찰되었으며, 조절부위에서 168개(27.50%), 암호부위에서 443개(72.50%)로, 조절부위의 변이의 개수에 대하여 암호부위의 변이의 개수의 비율은 2.64로 나타났다.

■ 하플로그룹 M7 (M7a1, M7b1)

모두 774개의 변이가 관찰되었으며, 조절부위에서 168개(21.71%), 암호부위에서 606개(78.29%)로, 조절부위의 변이의 개수에 대하여 암호부위의 변이의 개수의 비율은 3.61로 나타났다.

■ 하플로그룹 F1b1

모두 609개의 변이가 관찰되었으며, 조절부위에서 212개(34.81%), 암호부위에서 397개(65.19%)로, 조절부위의 변이의 개수에 대하여 암호부위의 변이의 개수의 비율은 1.87로 나타났다.

■ 하플로그룹 G1a1

모두 765개의 변이가 관찰되었으며, 조절부위에서 171개(22.35%), 암호부위에서 594개(77.65%)로, 조절부위의 변이의 개수에 대하여 암호부위의 변이의 개수의 비율은 3.47로 나타났다.

■ 하플로그룹 B4 (B4a, B4c1c)

모두 513개의 변이가 관찰되었으며, 조절부위에서 204개(39.77%), 암호부위에서 309개(60.23%)로, 조절부위의 변이의 개수에 대하여 암호부위의 변이의 개수의 비율은 1.51로 나타났다.

■ 하플로그룹 N9a2a

모두 299개의 변이가 관찰되었으며, 조절부위에서 97개(32.44%), 암호부위에서 202개(67.56%)로, 조절부위의 변이의 개수에 대하여 암호부위의 변이의 개수의 비율은 2.08로 나타났다.

■ 하플로그룹 M9;G;D

모두 565개의 변이가 관찰되었으며, 조절부위에서 101개(17.88%), 암호부위에서 464개(82.12%)로, 조절부위의 변이의 개수에 대하여 암호부위의 변이의 개수의 비율은 4.59로 나타났다.

■ 하플로그룹 Y1군

모두 361개의 변이가 관찰되었으며, 조절부위에서 115개(31.86%), 암호부위에서 246개(68.14%)로, 조절부위의 변이의 개수에 대하여 암호부위의 변이의 개수의 비율은 2.14로 나타났다.

각 하플로그룹에서의 변이의 비율은 다양해서 하플로그룹 B4의 경우가 가장 작은 비율(1.51)을 보여주었으며(암호부위에서 60.23%, 조절부위에서 39.77%), 하플로그룹 M9;G;D에서 가장 높은 비율(4.59)을 보여주었다(암호부위에서 82.12%, 조절부위에서 17.88%).

2.6 공통 변이

186명의 한국인 각 개체에서 미토콘드리아 DNA 전체염기서열 분석결과 확인된 변이 중 각 개체에서 전체 또는 대부분에서 공통적으로 관찰되는 변이가 확인되었다.

■ 모든 개체에서 공통적으로 관찰된 변이

73번, 263번, 750번, 1438번, 4769번, 7028번, 11719번, 14766번, 15326번째 뉴클레오티드 위치에 관찰되었다. (73G, 263G, 750G, 1438G, 4769G, 7028G, 11719A, 14766T, 15326G)

■ 약 절반 이상의 개체에서 공통적으로 관찰된 변이

489번, 2706번, 8701번, 9540번, 10398번, 10400번, 10873번, 12705번, 14783번, 15043번, 15301번, 16223번, 16519번째 뉴클레오티드 위치에서 발견되었다. (489C, 2706G, 8701G, 9540C, 10398G, 10400T, 10873C, 12705T, 14783C, 15043A, 15301A, 16223T, 16519C)

2.7 개별 변이(private mutation)

모든 한국인 개체의 미토콘드리아 DNA 전체염기서열분석결과 같은 하플로그룹 안에서도 다르게 나타나는 개별변이가 관찰되었다. HaploGrep을 이용한 분석결과 세부 하플로그룹 결정에 관여되는 변이는 아니지만 지역적 또는 세계적인 개체 변이로 간주되는 변이들이

있었으며, 이들 중 2개체 이상에서 공통적으로 나타나는 변이들을 관찰할 수 있었다. 각 하플로그룹 안에서 공통적으로 관찰된 개별변이는 다음과 같다. (표 7 참조)

■ 하플로그룹 D4a1

14,926번째 뉴클레오티드 위치에서 개별변이(14926G)가 전체 11개체 중 2개체에서 관찰되었다.

■ 하플로그룹 D4b1a1

4,113번째 뉴클레오티드 위치에서 개별변이(4113A), 4,646번째 뉴클레오티드 위치에서 개별변이(4646C)가 전체 6개체에서 모두 관찰되었다.

■ 하플로그룹 D4d

6,524번째 뉴클레오티드 위치에서 개별변이(6524C)가 전체 4개체 중 2개체에서 관찰되었다.

■ 하플로그룹 A5a

5,250번째 뉴클레오티드 위치에서 개별변이(5250C)가 전체 6개체 중 2개체에서 관찰되었다.

■ 하플로그룹 A5a1a

8,619번째 뉴클레오티드 위치에서 개별변이(8619T)가 전체 11개체 중 2개체에서 관찰되었다.

■ 하플로그룹 F1b1a2

3,395번째 뉴클레오티드 위치에서 개별변이(3395G)가 전체 4개체 중 2개체에서 관찰되었다.

■ 하플로그룹 G1a1a

9,254번째 뉴클레오티드 위치에서 개별변이(9254G)가 전체 11개체 중 2개체에서 관찰되었다. 9,410번째 뉴클레오티드 위치에서 개별변이(9410G)가 전체 11개체 중 2개체에서 관찰되었다. 9,494번째 뉴클레오티드 위치에서 개별변이(9494G)가 전체 11개체 중 2개체에서 관찰되었다.

■ 하플로그룹 G1a1a1

1,822번째 뉴클레오티드 위치에서 개별변이(1822C), 9,854번째 뉴클레오티드 위치에서 개별변이(9854C)가 전체 8개체 중 6개체에서 관찰되었다.

■ 하플로그룹 B4a

15,926번째 뉴클레오티드 위치에서 개별변이(15926T)가 전체 4개체 중 4개체에서 관찰되었다.

■ 하플로그룹 B4+16261

6,863번째 뉴클레오티드 위치에서 개별변이(6863G)가 전체 2개체 중 2개체에서 관찰되었다.

■ 하플로그룹 B4a1c1a

8,595번째 뉴클레오티드 위치에서 개별변이(8595T)가 전체 4개체 중 2개체에서 관찰되었다.

■ 하플로그룹 N9a2a

3,866번째 뉴클레오티드 위치에서 개별변이(3866C)가 전체 10개체 중 3개체에서 관찰되었다.

■ 하플로그룹 Y1

9,254번째 뉴클레오티드 위치에서 개별변이(9254G)가 전체 9개체 중 2개체에서 관찰되었다.

3. 하플로그룹 분류

14개(D4a, D4a3, D4b1, D5b, A5a, M7a1, M7b1, F1b1, G1a1, B4a, B4c1c, N9a2a, M9;G;D, Y1)의 하플로그룹 (조절부위 근거)에 해당되었던 186 개체의 각 미토콘드리아 DNA 전체염기서열분석결과 확인된 변이는 HaploGrep를 이용하여 Phylotree 16에 따라 하위 하플로그룹으로 분류할 수 있었다. (표 8 참조) 계통발생학나무를 따라

각 하플로그룹을 결정하는 주요 변이는 표 9에 제시하였다.

3.1. 하플로그룹 D (D4a, D4a3, D4b1, D5b)

하플로그룹 D4a(40개체)는 미토콘드리아 DNA 전체염기서열분석을 통해 D4a(3개체), D4a1(11개체), D4a1a1(2개체), D4a1b(10개체), D4a1c(4개체), D4a2(8개체), D4a2a(1개체), D4f1(1개체) 등 모두 8유형의 하위 하플로그룹으로 세분화할 수 있었다.

하플로그룹 D4a3, D4b1a1, D5b의 경우 미토콘드리아 DNA 전체염기서열 분석에도 불구하고 추가적으로 세분화된 하위 하플로그룹은 없었으나, 하위 하플로그룹인 D4a3b, D4b1a1, D5b1b 등으로 각각 세분화될 수 있었다.

각 개체별 염기서열 및 변이를 분석하여 보았을 때, 같은 하플로그룹 내에서도 서로 다른 변이가 관찰되었다. 하플로그룹 D4a1 11개체 중 3개체와 2개체에서 각각 서로 동일한 염기서열 및 변이를 보여주었고 나머지 6개체에서는 서로 다른 일부 변이가 관찰되었다. 하플로그룹 D4a1b 역시 10개체 중 3개체와 2개체에서 각각 서로 동일한 염기서열 및 변이를 보여주었고 나머지 4개체에서는 서로 다른 일부 변이가 관찰되었다. 하플로그룹 D4a2 8개체 중 4개체와 2개체에서 각각 서로 동일한 염기서열 및 변이를 보여주었고 나머지 2개체에서는 서로 다른 일부 변이가 관찰되었다. 하플로그룹 D4b1 6개체 중 3개체에서 서로 동일한 염기서열 및 변이를 보여주었고 나머지 3개체에서는 서로 다른 일부 변이가 관찰되었다. 이외 하플로그룹의 각 개체는 서로 다른 일부 변이가 관찰되었다.

3.2. 하플로그룹 A5a

하플로그룹 A5a(20개체)는 전체염기서열분석에서 확인된 변이를 통해 하플로그룹 A5a(6개체), A5a1a(11개체), A5a1a1(1개체), A5a1a2(1개체), A5a3(1개체) 등의 하위 하플로그룹으로 세분화할 수 있었다.

하플로그룹 A5a의 각 개체의 염기서열을 비교 분석하였을 때, 6개체 중 2개체와 2개체에서 각각 서로 동일한 염기서열 및 변이를 보여주었고 나머지 2개체에서는 서로 다른 일부 변이가 관찰되었다.

하플로그룹 A5a1a 11개체 중 2개체와 2개체에서 각각 서로 동일한 염기서열 및 변이를 보여주었고 나머지 7개체에서는 서로 다른 일부 변이가 관찰되었다. 이외 하플로그룹의 각 개체는 서로 다른 일부 변이가 관찰되었다.

3.3 하플로그룹 M7군 (M7a1, M7b1)

하플로그룹 M7a1(9개체)는 전체염기서열분석결과 M7a1a(4개체), M7a1a1(1개체), M7a1a5a(1개체), M7a1a9(3개체) 등의 하위 하플로그룹으로 세분화할 수 있었다.

하플로그룹 M7b1(10개체)은 대부분이 하위 하플로그룹 M7b1a1a1(9개체)으로 세분화되었고, 1개체에서 하위 하플로그룹 M7b1a1a로 세분화될 수 있었다.

각 하플로그룹의 각 개체의 염기서열을 분석하였을 때, 하플로그룹 M7a1a 4개체 중 2개체는 서로 동일한 염기서열 및 변이를 보여주었고 나머지 2개체에서는 서로 다른 일부 변이가 관찰되었다. 이외 하플로그룹의 각 개체는 서로 다른 일부 변이가 관찰되었다.

3.4. 하플로그룹 F1b1

하플로그룹 F1b1(16개체)는 전체염기서열분석결과 하플로그룹 F1b1a(1개체), F1b1a1(4개체), F1b1a1a(4개체), F1b1a1a1(1개체), F1b1a1a2(2개체), F1b1a2(4개체) 등의 하위 하플로그룹으로 세분화되었다.

각 하플로그룹의 각 개체의 염기서열을 분석하였을 때, 하플로그룹 F1b1a1 4개체 중 2개체는 서로 동일한 염기서열 및 변이를 보여주었고 나머지 2개체에서는 서로 다른 일부 변이가 관찰되었다. 하플로그룹 F1b1a1a 4개체 중 3개체는 서로 동일한 염기서열 및 변이를 보여주었다. 이외 하플로그룹의 각 개체는 서로 다른 일부 변이가 관찰되었다.

3.5. 하플로그룹 N9a2a

하플로그룹 N9a2a(11개체)는 전체염기서열분석결과에도 하플로그룹

분류는 대부분 변화가 없었고(10개체), 1개체에서 하위 하플로그룹 N9a2a2로 세분화 될 수 있었다.

각 하플로그룹의 각 개체의 염기서열을 분석하였을 때, 하플로그룹 N9a2a 11개체 중 2개체, 2개체는 각각 서로 동일한 염기서열 및 변이를 보여주었고, 나머지 7개체에서는 서로 다른 일부 변이가 관찰되었다.

3.6. 하플로그룹 G1a1

하플로그룹 G1a1(19개체)은 전체염기서열분석결과 하위 하플로그룹 G1a1a(11개체), G1a1a1(8개체)로 세분화할 수 있었다. 4793G, 11914A, 827G 변이는 하플로그룹 G1a1a와 G1a1a1을 구분하게 하는 중요한 변이었다.

각 하플로그룹의 각 개체의 염기서열을 분석하였을 때, 하플로그룹 G1a1a 11개체 중 2개체는 서로 동일한 염기서열 및 변이를 보여주었고 나머지 9개체에서는 서로 다른 일부 변이가 관찰되었다. 하플로그룹 G1a1a1 8개체 중 3개체는 서로 동일한 염기서열 및 변이를 보여주었고 나머지 5개체에서는 서로 다른 일부 변이가 관찰되었다. 이외 하플로그룹의 각 개체는 서로 다른 일부 변이가 관찰되었다.

3.7. 하플로그룹 Y1

하플로그룹 Y1(12개체)은 대부분 Y1(9개체)로 분류되었고, 이외 하플로그룹 Y1a(1개체), Y1b1(1개체), Y1b1a(1개체)로 세분화될 수 있었다.

각 하플로그룹의 각 개체의 염기서열을 분석하였을 때, 하플로그룹 Y1 9개체 중 2개체는 서로 동일한 염기서열 및 변이를 보여주었고 나머지 7개체에서는 서로 다른 일부 변이가 관찰되었다.

3.8. 하플로그룹 B4 (B4a, B4c1c)

하플로그룹 B4a(16개체)는 전체염기서열분석결과 B4a(4개체), B4+16261(2개체), B4a1c1a(4개체), B4ac1a1(6개체)로 분류할 수 있었다.

하플로그룹 B4a군에서 미토콘드리아 DNA 조절부위에서 확인되는 변이만으로는 하위 하플로그룹 분류가 제한적이었으며, 전체염기서열에서 확인되는 변이 양상을 통해 하위 하플로그룹 유형 결정이 가능하였다. MitoTool을 이용하여 조절부위 변이를 근거로 분석하였을 때, 하플로그룹 B4a의 16개체 중 13개체가 여러 후보 하위 하플로그룹으로 제시되었는데(B4a; B4a1c1a1; B4i or B4a; B4i), 하위 하플로그룹으로 분류해주는 기준이 되는 일부 변이가 관찰되지 않음으로 계통발생학적 나무에서 상위 즉 조상의 계열에 가까운 것으로 간주되었기 때문으로 생각되었다. (Zhou Y, et al, 2016) 미토콘드리아 DNA 전체염기서열에서 나타나는 변이 양상을 분석하였을 때, 9개체가 하나의 하위 하플로그룹 (B4a; B4a1c1a1; B4i → B4a1c1a1, B4a;B4i → B4a)으로 분류될 수 있었다.

HaploGrep을 이용하여 분석한 경우, 조절부위에서 확인되는 변이로 하플로그룹을 분류한 경우, 10개체가 하플로그룹 B4+16261이었으나, 전체염기서열에서 확인된 변이로 분석하였을 때, 4개의 하위 하플로그룹 (B4a, B4+16261, B4a1c1a, B4a1c1a1)으로 분류될 수 있었다. 하플로그룹 B4a의 모든 개체에서 조절부위에서 확인되는 변이만 근거로 분석하였을 때와 전체염기서열에서 확인되는 변이를 근거로 분석하였을 때, 각각 전반적인 질점수(quality score)는 0.874에서 0.943으로 증가하였다.

각 하플로그룹의 각 개체의 염기서열을 분석하였을 때, 하플로그룹 B4a군 4개체에서 2개체는 서로 동일한 염기서열 및 변이가 관찰되었고 나머지 2개체는 서로 다른 일부 변이가 관찰되었다. 하플로그룹 B4+16261의 경우 2개체 모두 동일한 염기서열 및 변이가 관찰되었다. 이외 하플로그룹의 각 개체는 서로 다른 일부 변이가 관찰되었다.

3.9. 하플로그룹 M9;G;D

하플로그룹 M9;G;D로 분류되었던 17개체는 전체염기서열분석결과 D4b2a2(1개체), D4d(4개체), D4e2(2개체), D4e2a(2개체), D4f1(3개체), D4j(5개체)로 재분류할 수 있었다.

매크로하플로그룹 M9, G, D는 조절부위에서 확인되는 변이는 하위 하플로그룹 분류에는 거의 유용하지 않았는데 하위 하플로그룹 분류에 중요한 기준 변이 중 조절부위에서 확인되는 변이는 적기 때문이다. (Jin HJ, et al., 2006, Lee HY, et al., 2006) 17개체에서 미토콘드리아 DNA

전체 염기서열에서 확인된 변이가 있어야 하위 하플로그룹 분류가 가능하였다 (D4b2a2, D4d, D4e2, D4e2a, D4f1, D4j). 전체염기서열분석을 통해 암호부위에서 확인되는 변이의 정보는 매크로하플로그룹 M9, G, D의 하위 하플로그룹 분류에 있어서 중요할 것으로 생각된다.

각 하플로그룹의 각 개체의 염기서열을 분석하였을 때, 각 세부 하플로그룹으로 분류된 각 개체는 서로 다른 일부 변이가 관찰되었다.

4. 하플로타입 (Haplotype)

186명의 한국인의 미토콘드리아 DNA의 조절부위와 전체염기서열분석결과 각각 나타나는 하플로타입을 분석하였다. 각 염기서열을 비교하였을 때 2개 이상의 변이가 차이가 날 때 고유의 하플로타입으로 정의하였다. (Nilson M, et al., 2008, Parson W, et al., 2014) 조절부위에 근거하였을 때 70개의 하플로타입은 전체염기서열분석결과 137개의 하플로타입으로 나타났다. (표 10 참조)

■ 하플로그룹 D4a

40개체에서 조절부위로만 했을 때 하플로타입은 11개였으나 전체염기서열로 하였을 때 26개의 하플로타입으로 나타났다.

■ 하플로그룹 D4a3

3개체에서 조절부위로만 하였을 때, 하플로타입은 1개였으나 전체 염기서열로 하였을 때 3개의 하플로타입으로 나타났다.

■ 하플로그룹 D4b1

6개체에서 조절부위로만 하였을 때, 하플로타입은 1개였으나 전체 염기서열로 하였을 때 2개의 하플로타입으로 나타났다.

■ 하플로그룹 D5b

3개체에서 조절부위로만 하였을 때, 하플로타입은 2개였으나 전체 염기서열로 하였을 때 3개의 하플로타입으로 나타났다.

■ 하플로그룹 A5a

20개체에서 조절부위로만 하였을 때, 하플로타입은 12개였으나 전체 염기서열로 하였을 때 14개의 하플로타입으로 나타났다.

■ 하플로그룹 M7a1

9개체에서 조절부위로만 하였을 때, 하플로타입은 2개였으나 전체 염기서열로 하였을 때 8개의 하플로타입으로 나타났다.

■ 하플로그룹 M7b1

10개체에서 조절부위로만 하였을 때, 하플로타입은 6개였으나 전체 염기서열로 하였을 때 10개의 하플로타입으로 나타났다.

■ 하플로그룹 F1b1

16개체에서 조절부위로만 하였을 때, 하플로타입은 2개였으나 전체 염기서열로 하였을 때 11개의 하플로타입으로 나타났다.

■ 하플로그룹 G1a1

19개체에서 조절부위로만 하였을 때, 하플로타입은 8개였으나 전체 염기서열로 하였을 때 15개의 하플로타입으로 나타났다.

■ 하플로그룹 B4a

16개체에서 조절부위로만 하였을 때, 하플로타입은 8개였으나 전체 염기서열로 하였을 때 11개의 하플로타입으로 나타났다.

■ 하플로그룹 B4c1c

4개체에서 조절부위, 전체 염기서열 분석결과 모두 동일하게 1개의 하플로타입으로 나타났다.

■ 하플로그룹 N9a2a

11개체에서 조절부위로만 하였을 때, 하플로타입은 3개였으나 전체 염기서열로 하였을 때 9개의 하플로타입으로 나타났다.

■ 하플로그룹 M9;G;D

17개체에서 조절부위로만 하였을 때, 하플로타입은 7개였으나 전체

염기서열로 하였을 때 15개의 하플로타입으로 나타났다.

■ 하플로그룹 Y1

12개체에서 조절부위로만 하였을 때, 하플로타입은 6개였으나 전체 염기서열로 하였을 때 9개의 하플로타입으로 나타났다.

5. 점 이형세포질성(Point heteroplasmy)

5.1. 점 이형세포질성의 정의

점 이형세포질성은 다음과 같은 기준을 만족하는 경우로 정의하였다.
1) 이형세포질성을 이루는 변이들 중 부요소(minor component)가 적어도 40배 이상의 coverage를 가져야 하며 (Jin HJ, et al., 2006),
2) 미토콘드리아 DNA와 유사한 염기서열을 갖는 핵 DNA (nuclear mitochondrial DNA, NUMT)가 함께 증폭된 것으로 의심되는 경우는 제외하며, 3) mtDNA server의 분석 결과 해당 이형세포질성이 신뢰할 만한 결과로 확인된 것이었다(Weissensteiner H, et al., 2016).

5.2. 점 이형세포질성에서 coverage

이형세포성을 구성하는 부요소(minor component) 중 최소값은 하플로그룹 F1b1a1a에 속하는 한 개체의 2561번째 뉴클레오티드로, 그 비율은 0.61%, coverage는 40배였으며, 최대값은 하플로그룹 A5a에 속하는 한 개체의 13704번째 뉴클레오티드로 비율은 45.93%, coverage는 95배였다. (표 11 참조)

5.3. 점 이형세포질성의 분포와 양상

한국인 186개체의 시료에서 점 이형세포질성에 대한 분석결과, 이 중 40개체(21.51%)에서 52곳의 이형세포질성이 관찰되었다. 부위별로는 조절부위에서 16개(30.77%), 암호부위에서 36개(69.23%)가 관찰되었다 (표 11, 표 12 참조). 7개체에서 2개 이상의 점 이형세포질성을 가진 것으로 나타났으며, 1개체의 경우 5개의 점

이형세포질성이 있었던 것으로 확인되었다. 염기서열 위치로 보았을 때, 64번, 2561번 뉴클레오티드 위치에서 2번 반복해서 관찰되었고, 12개의 이형세포질성 변이가 16039번에서 16234번 사이에 몰려서 위치하고 나머지 40개가 64번에서 15987사이에 존재하는 고르지 않은 분포를 보였다. 대개 조절부위에 비해 암호부위에서 이형세포질성이 3-4배 이상의 빈도로 발생함을 관찰하였으나, 하플로그룹 G1a1과 B4에서는 양쪽 부위에서 유사한 빈도로 발생하였음을 관찰하였다.

5.3.1. 하플로그룹 D4

모두 11개체에서 13곳의 이형세포질성이 관찰되었다.

■ 하플로그룹 D4a

1개체에서 3곳의 이형세포질성 변이가 관찰되었으며, 뉴클레오티드 위치로는 2844G/A(주요소/부요소, 2.18%), 5973G/A(2.76%), 16126T/C(4.82%) 등이었다.

■ 하플로그룹 D4a1

3개체에서 각각 1곳의 이형세포질성 변이가 관찰되었으며, 뉴클레오티드 위치로는 9457T/C(7.81%), 9742C/T(9.87%), 16103A/G(5.68%) 등이었다.

■ 하플로그룹 D4a1b

2개체에서 각각 1곳의 이형세포질성 변이가 관찰되었으며, 뉴클레오티드 위치로는 990T/C(3.12%), 2552T/C(1.12%) 등이었다.

■ 하플로그룹 D4a1c

2개체에서 각각 1곳의 이형세포질성 변이가 관찰되었으며 뉴클레오티드 위치로는 114C/T(5.11%), 4088C/T(27.93%) 등이었다.

■ 하플로그룹 D4a2a

1개체에서 1곳의 이형세포질성 변이가 관찰되었으며, 뉴클레오티드 위치로는 9064G/A(11.54%) 등이었다.

■ 하플로그룹 D4a3b

1개체에서 1곳의 이형세포질성 변이가 관찰되었으며, 뉴클레오티드 위치는 6325C/T(37.69%) 등이었다.

■ 하플로그룹 D4b1a1

1개체에서 1곳의 이형세포질성 변이가 관찰되었으며, 뉴클레오티드 위치로는 64C/T(26.04%) 등이었다.

5.3.2. 하플로그룹 A5a

모두 4개체에서 4곳의 이형세포질성이 관찰되었다.

■ 하플로그룹 A5

1개체에서 1곳의 이형세포질성 변이가 관찰되었으며, 뉴클레오티드 위치는 13704T/C(45.93%) 등이었다.

■ 하플로그룹 A5a1a

3개체에서 각 1곳의 이형세포질성 변이가 관찰되었으며, 뉴클레오티드 위치는 2383T/C(12.8%), 4050T/C(16.03%), 16094C/T(2.79%) 등이었다.

5.3.3. 하플로그룹 M7

모두 5개체에서 5곳의 이형세포질성이 관찰되었다.

■ 하플로그룹 M7a1a

1개체에서 1곳의 이형세포질성 변이가 관찰되었으며, 뉴클레오티드 위치는 13810A/G(22.37%) 등이었다.

■ 하플로그룹 M7a1a5a

1개체에서 1곳의 이형세포질성 변이가 관찰되었으며, 뉴클레오티드 위치는 1425T/C(2.45%) 등이었다.

■ 하플로그룹 M7a1a9

1개체에서 1곳의 이형세포질성 변이가 관찰되었으며, 뉴클레오티드 위치는 4728A/G(10.49%) 등이었다.

■ 하플로그룹 M7b1a1a

1개체에서 1곳의 이형세포질성 변이가 관찰되었으며, 뉴클레오티드 위치는 64C/T(17.66%) 등이었다.

■ 하플로그룹 M7b1a1a1

1개체에서 1곳의 이형세포질성 변이가 관찰되었으며, 뉴클레오티드 위치는 15686A/G(23.93%) 등이었다.

5.3.4 하플로그룹 F1b1

하플로그룹 F1b1a1a의 1개체에서 3곳의 이형세포질성 변이가 관찰되었으며, 뉴클레오티드 위치는 2561T/C(0.61%), 2644A/G(1.02%), 10503T/C(6.05%) 등이었다.

5.3.5. 하플로그룹 G1a1

모두 4개체에서 9곳의 이형세포질성 변이가 관찰되었다.

■ 하플로그룹 G1a1a

1개체에서 2곳의 이형세포질성 변이가 관찰되었으며, 뉴클레오티드 위치는 2580T/C(2.77%), 7606A/G(7.3%) 등이었다.

■ 하플로그룹 G1a1a

1개체에서 5곳의 이형세포질성 변이가 관찰되었으며, 뉴클레오티드 위치는, 12361A/G(18.75%), 16111C/T(17.68%), 16140T/C(18.24%), 16223T/C(21.67%), 16234C/T(19.88%) 등이었다.

■ 하플로그룹 G1a1a

1개체에서 1곳의 이형세포질성 변이가 관찰되었으며,

뉴클레오티드 위치는 16129A/G(12.35%) 등이었다.

■ 하플로그룹 G1a1a1

1개체에서 1곳의 이형세포질성 변이가 관찰되었으며,
뉴클레오티드 위치는 15987C/T(18.36%) 등이었다.

5.3.6. 하플로그룹 B4

모두 6개체에서 6곳의 이형세포질성 변이가 관찰되었다.

■ 하플로그룹 B4a

1개체에서 1곳의 이형세포질성 변이가 관찰되었으며,
뉴클레오티드 위치는 9618C/A(2.73%) 등이었다.

■ 하플로그룹 B4+16261

1개체에서 1곳의 이형세포질성 변이가 관찰되었으며,
뉴클레오티드 위치는 6892G/A(2.7%) 등이었다.

■ 하플로그룹 B4a1c1a

1개체에서 1곳의 이형세포질성 변이가 관찰되었으며,
뉴클레오티드 위치는 8805G/A(29.28%) 등이었다.

■ 하플로그룹 B4a1c1a1

3개체에서 각각 1곳의 이형세포질성 변이가 관찰되었으며,
뉴클레오티드 위치는 93A/G(3.79%), 16092T/C(3.1%),
16150C/T(9.58%) 등이었다.

5.3.7. 하플로그룹 N9a2a

모두 4개체에서 6곳의 이형세포질성 변이가 관찰되었다.

■ 하플로그룹 N9a2a

1개체에서 2곳의 이형세포질성 변이가 관찰되었으며,
뉴클레오티드 위치는 9137T/C(3.66%), 11884A/G(4.32%)

등이었다.

■ 하플로그룹 N9a2a

2개체에서 각각 1곳의 이형세포질성 변이가 관찰되었으며, 각각 뉴클레오티드 위치는 3335T/C(11.04%), 12868G/A(2.21%) 등이었다.

■ 하플로그룹 N9a2a2

1개체에서 2곳의 이형세포질성 변이가 관찰되었으며, 뉴클레오티드 위치는 896A/G(4.98%), 16129G/A(7.23%) 등이었다.

5.3.8. 하플로그룹 M9;G;D

모두 5개체에서 6곳의 이형세포질성 변이가 관찰되었다.

■ 하플로그룹 D4e2a

1개체에서 1곳의 이형세포질성 변이가 관찰되었으며, 뉴클레오티드 위치는 2561T/C(0.78%) 등이었다.

■ 하플로그룹 D4f1

1개체에서 1곳의 이형세포질성 변이가 관찰되었으며, 뉴클레오티드 위치는 6261G/A(4.74%) 등이었다.

■ 하플로그룹 D4j

1개체에서 2곳의 이형세포질성 변이가 관찰되었으며, 뉴클레오티드 위치는 3062T/C(17.53%), 4710T/C(8.3%) 등이었다.

■ 하플로그룹 D4j

2개체에서 각각 1곳의 이형세포질성 변이가 관찰되었으며, 뉴클레오티드 위치는 11598C/T(11.66%), 16039G/A(8.94%) 등이었다.

5.3.9. 하플로그룹 Y1

하플로그룹 Y1에서는 이형세포질성 변이가 관찰되지 않았다.

5.3.10. 동일개체에서 나타나는 이형세포질성 변이

동일개체에서 나타나는 이형세포질성의 뉴클레오티드 구성을 분석해 보았다. 3개의 이형세포질성 변이가 있던 2개의 개체에서 각각 T/C (x2) A/G, G/A (x2) T/C로, 5개의 이형세포질성 변이가 있던 개체에서는 T/C (x2) C/T (x2) A/G로 관찰되었다. 2개의 이형세포질성 변이가 있던 4개체에서는 각각 A/G G/A, T/C (x2), T/C (x2), T/C A/G로 구성되어 있었다.

5.3.11. 미토콘드리아 염기서열 부위와 이형세포질성 변이

조절부위에서는 과변이부위 I에 12개의 과변이부위 II에 4개의 이형세포질성 변이가 관찰되었다. 암호부위에서는 12S rRNA 유전자부위에서 3개, 16S rRNA 유전자부위에서 8개, NADH dehydrogenase 1 유전자부위에서 3개, NADH dehydrogenase 2 유전자부위에서 2개, Cytochrome c oxidase 1 유전자부위에서 4개, Cytochrome c oxidase 2 유전자부위에서 1개, ATP synthase 6 유전자부위에서 3개, Cytochrome c oxidase 3 유전자부위에서 3개, NADH dehydrogenase 4L 유전자부위에서 1개, NADH dehydrogenase 4 유전자부위에서 2개, NADH dehydrogenase 5 유전자부위에서 4개, Cytochrome B 유전자부위에서 1개 tRNA Pro에서 1개가 관찰되었다.

5.3.12. 하플로그룹을 결정하는 변이 부위에 형성된 점이형세포질성 변이

한국인의 미토콘드리아 DNA에서 확인된 52곳의 점이형세포질성 변이 중에서 하플로그룹을 결정하는 주요 변이가 위치한 곳에 형성된 점 이형세포질성변이가 9곳에서 확인되었다. 다만 이들 변이는 각 변이가 확인된 개체의 하플로그룹이 아닌 다른 계열의 하플로그룹을 결정하는

주요변이었다. 각각의 변이는 다음과 같았다.

- 하플로그룹 B4a1c1a1의 1개체에서 93번째 뉴클레오티드: A&G (A93G = 하플로그룹 B5a2a를 결정하는 변이)
- 하플로그룹 B4a1c1a1 16092번째 뉴클레오티드: T&C (T16092C = 하플로그룹 B2o, B2a4를 결정하는 변이, 하플로그룹 B4a3, B4c1a2a를 결정하는 주요 변이 중 하나)
- 하플로그룹 D4a의 1개체에서 16126번째 뉴클레오티드: T&C (T16126C = 하플로그룹 D5a3a1a를 결정하는 주요 변이 중 하나)
- 하플로그룹 D4a1b의 1개체에서 990번째 뉴클레오티드: T&C (T990C = 하플로그룹 D4h3b를 결정하는 주요 변이 중 하나)
- 하플로그룹 G1a1a의 1개체에서 16129번째 뉴클레오티드: A&G (A16129G = 하플로그룹 L2' 3' 4' 6을 결정하는 주요 변이 중 하나, G16129A! = 하플로그룹 G1b2/G1b3/G1b4 계열을 결정하는 변이)
- 하플로그룹 G1a1a의 1개체에서 12361번째 뉴클레오티드: A&G (A12361G = 하플로그룹 G1b를 결정하는 변이 중 하나)
- 하플로그룹 G1a1a의 1개체에서 16223번째 뉴클레오티드: T&C (T16223C = 하플로그룹 R을 결정하는 변이 중 하나), 16234번째 뉴클레오티드: & (C16234T = 하플로그룹 G2a5를 결정하는 변이 중 하나)
- 하플로그룹 N9a2a2의 1개체에서 16129번째 뉴클레오티드: G&A (A16129G= 하플로그룹 L2' 3' 4' 6을 결정하는 변이 중 하나, G16129A! = 하플로그룹 N9a1' 3을 결정하는 변이,

G16129A! = 하플로그룹 N9b1b를 결정하는 변이 중 하나)

5.4. 세포핵 미토콘드리아 염기서열(NUMT)과 점이형세포질성

생거분석이나 VCF 보고서, IGV 등에서 섞여 있는 상태로 분석되었더라도 mtDNA-Server에서 해당 위치가 NUMT(nuclear mitochondrial sequence; 세포핵미토콘드리아 염기서열)의 가능성이 있는 것으로 보고한 경우에는 이형세포질성이 아닌 것으로 간주하였다. 생거분석에서 발견된 152번과 146번 뉴클레오티드와 IGV에서 확인된 204번, 709번, 3150번, 4218번, 9948번, 15261번, 15924번 뉴클레오티드가 이러한 경우에 해당되었다.

고찰

1. 차세대염기서열분석기법에 의한 미토콘드리아 DNA 전체염기서열분석

1.1 염기서열부위와 coverage

본연구에서 차세대염기서열분석기법을 적용하여 개정 케임브리지 표준염기서열에 따라 한국인의 미토콘드리아 DNA의 전체 염기서열을 해독할 때, 염기서열의 부위에 따라 다른 coverage를 보인 점은 Ion Torrent PGM 기반의 다른 연구(Seo SB, et al., 2015, Zhou Y, et al, 2016)와 유사한 양상이었다. Seo 등의 연구에서 높은 coverage를 보였던 염기서열부위로서 2,409번에서 3,201번 사이의 부분과, 낮은 coverage를 보였던 염기서열부위로서 13,271번에서 14,859번째 뉴클레오티드 위치를 제시했던 점, Zhou 등의 연구에서 낮은 coverage를 보였던 염기서열부위로서 13600번에서 13800번째 뉴클레오티드 위치, 14,100번에서 14,900번째 뉴클레오티드 위치를 제시했던 점 등은, 본연구에서 최고 높은 coverage를 보인 염기서열부위로 2,600번에서 2,900번 사이, 500배 이하의 낮은 coverage를 보인 염기서열부위로 13,600번에서 14,800번 사이(NADH 탈수소효소 아단위 5 & 6 유전자부위)였던 점과 유사하다. 본 연구에서 뿐만 아니라 다른 연구에서도 유사하게 나타나는 이러한 현상은 높은 coverage를 보였던 부위에 비해 낮은 coverage를 보였던 부위에서 중합체 뻗기부위(polymeric stretch region)가 더 많이 위치하는 등의 미토콘드리아 DNA 염기서열 부위별 특성 때문으로 생각되었다. (King JL, et al., 2014, Seo SB, et al, 2015, Zhou Y, et al, 2016) (표 13 참조)

1.2 VCF의 변이 검출과 확인

VCF에서 보고되지 않았거나 오검출된 변이에 있어서, 다른 연구와 비교해 보았다. (표 14 참조). 모든 연구에서 공통적으로

오검출되었다고 했던 염기서열부위는 8,281번에서 8,289번째 뉴클레오티드 위치였다. 중국 한족의 연구에서 VCF의 변이 검출 보고결과와 IGV로 확인한 결과와 비교하여 확인된 오검출 결과는 본연구 결과와 매우 유사하였다. 이들 부위들은 뉴클레오티드 동형중합체(homopolymer, >2)를 형성하는 부위라는 점에서, 변이의 오검출은 이러한 특성과 관련된 것으로 생각된다. 본 연구에서 9,824번째 뉴클레오티드 위치에서 세개의 대립형질(tri-allele) 변이가 확인된 점에 있어서, 중국 한족에 대한 연구에서도 동일한 결과를 제시하였었다. (Parson W, et al, 2013, Seo SB, et al, 2015, Zhou Y, et al, 2016)

조절부위의 과변이부위II에서 시토신이 연이어 염기서열을 만드는 부위(303-309번, 311-315번)에서는 시토신 삽입을 정확하게 검출하지 못했다. 이는 Parson 등이 Ion Torrent PGM기반의 차세대염기서열분석기법에 의한 분석결과와 생거기법에 의한 염기서열분석결과를 비교한 연구에서도 이 부위에 대하여 시토신 삽입에 대한 불일치가 확인되었으며, 다른 연구들에서도 이 부위에 대한 차세대염기서열분석기법에서는 정확하게 검출되지 않아 변이의 부위로 포함시키지 않았다. 뉴클레오티드 중합체 뻗기부위(homopolymer stretch region) 및 길이 이형세포질성에 대한 분석에 있어서 VCF에 의한 결과에 근거한 분석은 제한점이 있는 것으로 보여서, 이들 부위에 대해서는 IGV 등으로 염기서열을 확인하는 것이 필요하며, 미토콘드리아 DNA 염기서열분석에 있어서 정렬과 알고리즘에 있어서 이러한 미토콘드리아 DNA의 특성을 반영되어야 할 것이다. (Parson W, et al., 2013, Seo SB, et al., 2015, Zhou Y, et al., 2016)

2. 한국인에서 미토콘드리아 DNA의 유전적 특징

2.1 한국인에서 변이의 분포와 양상

본연구에서 186명의 한국인을 대상으로 한 전체염기서열분석결과 455곳의 뉴클레오티드 위치에서 6,495개의 변이가 관찰되었으며, 평균 1개체당 34.9개의 변이가 있는 것이었다. 조절부위에서 1,682개 (25.9%), 암호부위에서 4,813개 (74.1%)가 관찰되었으며, 이중 대부분의 변이는 치환으로서 6,336개(97.55%), 나머지는 삽입결실이

159개 (2.45%) 관찰되었던 점을 다른 민족과 함께 비교해 보았다. (표 15 참조)

■ 중국 한족

107명의 한족을 대상으로 하였으며 725곳의 뉴클레오티드 위치에서 4,022개의 변이가 관찰되었고, 이는 평균 1개체당 37.6개의 변이가 관찰되는 것이었다. 조절부위에서 관찰된 변이는 892개(22.18%)였다. 변이의 구성으로는 치환에 의한 변이가 3,919개 (97.44%), 삽입결실에 의한 변이가 103개 (2.56%)였다. (Zhou Y, et al., 2016)

■ 에스토니아인

114명의 에스토니아인을 대상으로 하였으며, 512곳의 뉴클레오티드 위치에서 2,663의 변이가 관찰되었으며, 이는 평균 1개체당 23.4개의 변이가 관찰되는 것이었다. 607개 (22.8%)는 조절부위에서, 나머지 2,056개 (77.2%)는 암호부위에서 관찰되었다. (Stoljarova M, et al., 2016)

■ 미국인 (아프리카인 미국인, 코카시안인, 히스패닉인)

283명의 미국인으로 87명의 아프리카인미국인, 83명의 코카시안인, 113명의 히스패닉인을 대상으로 하였다. 11,607개의 변이가 1,353곳의 뉴클레오티드 위치에서 관찰되었고, 이는 1개체당 평균 41.0개의 변이가 관찰되었다. 8,669개 (74.7%)의 변이가 암호부위에서 관찰되었다. (King JL, et al., 2014)

조절부위와 암호부위에서 관찰되는 변이의 빈도는 여러 민족에서 유사하게 조절부위의 변이가 22~25% 범위내에서 관찰되는 양상을 보임을 알 수 있었다. 한국인과 비교하였을 때, 여러 인종을 포함하는 미국인의 경우 더 많은 곳의 뉴클레오티드 위치에서 변이가 관찰되었으며, 1개체당 관찰되는 평균 변이의 수도 가장 많았다. 동아시아 안에서 거주하는 중국의 한족과 한국인을 같이 비교하였을 때, 변이의 구성이나 분포가 서로 유사한 양상을 보이고 있음을 알 수 있었다. (표 15 참조)

2.2 한국인에서 공통변이

한국인에서 나타나는 고유의 유전적 다양성을 알아보기 위해 186명의 한국인 전체에서 공통으로 나타나는 변이와 절반이상에서 관찰되는 변이들을 개정 캠브리지 표준서열에 근거하여 분석하고 이를 같은 동아시아에 있는 중국의 한족과 일본인과 비교해 보았다. 일본인의 경우 조절부위에 대한 분석자료만 가능해서 비교분석에 제한은 있었으나, 한국인, 중국 한족, 일본인에서 유사한 경향을 보임을 알 수 있었다. 다만 동아시아 이외에 에스토니아인과 미국인을 포함하여 분석하였을 때, 모든 개체에서 공통적으로 나타나는 변이의 경우 상당한 부분의 변이는 다른 민족에서도 나타나기 때문에 이들 변이들이 각 민족의 유전적 특성으로 보기는 어려울 것으로 생각되었다. 각 민족에서 절반 이상의 개체에서 나타난 변이의 경우에는 한국인과 중국 한족은 거의 동일한 양상을 보이지만 그 외 다른 민족과의 비교에서는 다른 양상을 보이고 있음을 알 수 있다. (Behar DM, et al., 2012, King JL, et al., 2014, Maruyama S, et al., 2013, Stoljarova M, et al., 2016, van Oven M, et al., 2009, Zhou Y, et al., 2016) (표 16 참조)

2.3 한국에서 하플로그룹의 세분화 양상

미토콘드리아 DNA 조절부위로만 근거하였을 때 186명의 한국인에서 14개의 하플로그룹(조절부위)은, 전체염기서열분석결과 47개의 하플로그룹으로 세분화될 수 있었다. 조절부위에 근거하여 한국인에서 흔히 나타나는 하플로그룹 D, A5a, M7, G1a1, B4, N9a2a, 세분화가 안되어 큰 군으로 묶였던 하플로그룹 M9;G;D, 제주도에서 높은 빈도로 나타나는 하플로그룹 Y1에 대하여 전체염기서열분석 후 세분화되는 양상을 분석해 보았다.

하플로그룹 D4의 4개의 하플로그룹이 8개의 하위 하플로그룹으로 세분화되었고, 하플로그룹 M9;G;D는 모두 6개의 하플로그룹 D의 하위 하플로그룹으로 재분류되었다. 이들 군의 경우 암호부위와 조절부위의 변이의 비를 보면 각각 3.48, 4.59로, 전체 변이 중 암호부위에 있는 변이가 훨씬 많은 부분을 차지하고 있다. 따라서 암호부위 변이 분석을 포함하는 전체염기서열분석결과가 하플로그룹을 결정하는데 더 정확한 정보를 줄 수 있음을 알 수 있었다. 하플로그룹 A5a군도 5개의 하위 하플로그룹으로, 2개의 하플로그룹 M7은 모두 7개의 하위 하플로그룹으로, 하플로그룹 F군은 6개의 하위 하플로그룹으로 분류될 수 있었다.

하플로그룹 B군의 경우, 암호부위와 조절부위의 변이의 비가 1.51로 다른 하플로그룹에 비해 낮게 나타나고, 조절부위를 근거로 하였을 때 하플로그룹이 하위 하플로그룹으로 세분화되지 못하고 상위 하플로그룹으로 묶여서 보여줄 뿐만 아니라 하플로그룹 분석툴 (MitoTool, Haplogrep)에 따라 하플로그룹 분류에 차이가 나는 결과를 보여주었으나, 전체염기서열분석결과는 명확하게 하위 하플로그룹으로 세분화시켜주었다.

대조적으로 하플로그룹 G1a1의 경우 약 절반정도에서 1개의 하위 하플로그룹을 추가하여 세분화 할 수 있었고, 하플로그룹 N9a2a의 경우 1개의 하위 하플로그룹이 추가적으로 세분화 될 수는 있었으나 대부분은 그대로 하플로그룹 N9a2a로 변화가 없었다. 하플로그룹 Y1군의 경우도 3군의 하위 하플로그룹을 추가적으로 세분화할 수 있었지만 대부분은 그대로 Y1군으로 변화가 없었다.

하플로그룹 Y1의 경우 제주도에서 흔히 관찰되는 유형이다. 제주도는 작고 고립된 인구를 가진 곳으로 오랜 세월 동안 다른 지역 인구와의 교류가 제한되었던 곳이다. 따라서 이 인구에 속한 각 개체들은 유전적으로 서로 밀접하게 연관되어 있을 것으로 기대되었기에, 미토콘드리아 DNA 전체 염기서열분석결과 확인된 암호부위 변이로도 하플로그룹 Y1의 각 개체를 식별하는 것은 여전히 쉽지 않았다.

본연구에서 분석한 한국인의 하플로그룹의 양상은 일본인과 중국 한족과 유사하였다. 일본인에서 하플로그룹 D4가 가장 높은 빈도로 관찰되었다. 107명의 한족에서 60개의 하플로그룹이었으나 전체염기서열로 근거하였을 때 74개의 하플로그룹으로 세분화되었다. 한족에서 나타난 주요 하플로그룹으로는 하플로그룹 M, D, F, B, C, A, N 등으로, 매크로하플로그룹 M(하플로그룹 D, G, M)이 약 48%를 차지하고 있던 점은 한국인에서도 매크로하플로그룹 M이 약 57%였음과 유사한 결과였다. 또한 조절부위에 근거하였을 때보다 전체염기서열에 근거하였을 때, 하플로그룹이 더 세분화되는 경향도 유사하게 나타났다. 본연구에서 조절부위만으로 하였을 때는 하플로그룹 M9;G;D로 나타나서 세분화되지 못했던 군이 전체염기서열 분석후에는 하플로그룹 D의 하위 하플로그룹으로 재분류되었던 것과 유사하게 한족에서도 조절부위에 근거했을 때는 하플로그룹 M으로 나타났던 것이 전체염기서열 분석후에는 하플로그룹 D와 G 등의 하위 하플로그룹으로 다시 결정되는 유사한 양상이 관찰되었다. [표 17, 표 18 참조] (Maruyama S, et al., 2013, Zhou Y, et al., 2016)

미국인 283명의 개체에 대한 전체염기서열분석결과 전체 208개의 하플로그룹이 확인되었고, 각 인종별로 세분화하여 보면 아프리카(87명), 코카시안(83명), 히스패닉(113명)에서 각각 70개, 79개, 70개의 하플로그룹으로 세분화되었다. 아프리카 미국인에서 주요 하플로그룹으로 하플로그룹 L이었고, 코카시안 미국인의 경우 하플로그룹 H, U, T, K 등이 있었으며, 히스패닉 미국인의 경우 하플로그룹 A, C, B, H, L, U, D, T 등이 있었다. 에스토니아의 경우 114명에서 87개의 하플로그룹으로 세분화되었다. 주요 하플로그룹으로는 D, HV, I, J, M, N, R, T, U, W, X 등으로 하플로그룹 HV가 약 47%, 하플로그룹 U가 약 24%를 차지하고 있었고, 하플로그룹 D의 경우 1례가 있었다. 이러한 결과는 한국인과 중국 한족에서 주로 나타나는 하플로그룹과 다른 양상으로 나타남을 알 수 있었다. (King JL, et al., 2014, Maruyama S, et al., 2013, Stoljarova M, et al., 2016, Zhou Y, et al., 2016)

조절부위를 근거했을 때와 전체염기서열을 근거하였을 때 새로운 하플로그룹으로 재분류되는 현상은 본연구와 중국 한족 뿐만 아니라 다른 연구에서도 유사하게 관찰되었다. (표 18 참조) 본연구에서는 하플로그룹 M9;G;D(전체의 약 9%)에서 하플로그룹의 재분류가 있었고, 한족의 연구에서는 약 6.5%, 미국인에서는 3.2%, 에스토니아 연구에서 0.8%(1개체)에서 있었다. 재분류되는 양상은 다른 계통의 하플로그룹으로 재분류되거나, 같은 계통이나 세분화가 아닌 다른 하위 하플로그룹으로 재분류되는 현상으로 나타났다. 특히 하플로그룹 D, G, M에서는 공통적으로 이러한 재분류가 있었다. 따라서 하플로그룹을 결정할 때, 특히 동아시아에서는 매크로하플로그룹 M이 주요 하플로그룹이라는 점을 감안한다면, 조절부위에 근거한 하플로그룹 분석자료는 유전적 다양성에 대한 분석에 제한점이 있을 수 있고, 전체염기서열을 고려해야 할 것으로 생각된다. (King JL, et al., 2014, Maruyama S, et al., 2013, Stoljarova M, et al., 2016, Zhou Y, et al., 2016)

2.4 한국인에서 나타나는 하플로타입(haplotype)의 양상

전체염기서열분석결과 하플로타입의 개수가 증가하여 개체수에 근접하는 경향을 보여주었고, 이러한 경향은 다른 연구와 유사하였다. (표 10, 그림 7 참조) 본 연구에서 186명의 개체에서 조절부위에

근거하였을 때 확인된 70개의 하플로타입이 137개의 하플로타입으로 관찰되었다. 이는 중국 한족의 연구에서도 유사한 경향을 보여주었는데, 107명의 개체에서 조절부위로 근거하였을 때 103개의 하플로타입이었고 전체염기서열분석에서는 107개로 나타났다. 미국인(588명, 아프리카인 170명, 코카시안 263명, 히스패닉 155명)에 대하여 생거기법으로 전체염기서열을 분석한 연구에서, 조절부위에 근거하였을 때 하플로타입이 470개(아프리카인 130, 코카시안 211, 히스패닉 130)였던 것이, 전체염기서열에 근거하였을 때 하플로타입은 575개(아프리카인 169, 코카시안 259, 히스패닉 147)였다. 또한 다른 연구에서도 전체염기서열분석결과 개체수에 근접한 하플로그룹 개수를 보여주었는데, 미국인에 대한 다른 연구에서 283명의 개체에 대하여 전체염기서열 분석결과 279개의 하플로타입이 확인되었고, 세부적으로 보면 아프리카인 미국인 (87명), 코카시안 미국인 (83명), 히스패닉 미국인 (113명)에서 하플로타입은 각각 85, 83, 111개로 나타났다. 에스토니아인에 대한 연구에서도 114명의 개체에서 100개의 하플로타입이 확인되었다. (Just RS, et al., 2015, King JL, et al., 2014, Maruyama S, et al., 2013, Stoljarova M, et al., 2016, Zhou Y, et al., 2016)

2.5 한국인에서 나타나는 개별변이 양상

본연구에서 하플로그룹 결정에 기여하지 않으면서도 같은 하플로그룹임에도 서로 다른 변이들이 관찰되었다. 이러한 변이들은 다른 민족의 연구에서도 관찰되는 현상이었다. 하나의 개체에서만 발견되는 변이라면 개체의 자발적 돌연변이로 여겨질 수 있겠으나, 2개체 이상에서 발견되는 변이라면 그러한 변이에 의해 새로운 계열로 정의될 수 있는 근거가 될 수 있을 것이다. 특히 한국인의 연구에서 다른 민족과 비교해 보았을 때, 하플로타입은 개체수에 근접한 개수를 보여주면서도, 결정된 하플로그룹의 수는 개체수에 비해 적은 점이 관찰되었다. 이는 한국인에서 잠재적으로 새로운 하위 하플로그룹의 가능성을 시사하는 소견일 수도 있다. 그러나 이들 개체 사이에 서로 친족관계가 없음에도 새로운 변이를 공통으로 가지고 있다고 관찰되었을지라도, 새로운 세부군으로 간주하기 위해서는 그들 사이 공통적인 조상에 대한 정보에 대한 분석이 필요할 것이며, 또한 변이의 관찰이 반복적으로 관찰된다고 하는 것이 확인되는 등 더 많은 연구가

필요할 것이다. (Kong QP, et al., 2010, Maruyama S, et al., 2013, van Oven M, 2010) (표 7 참조)

3. 한국인에서 미토콘드리아 DNA 점이형세포질성

점 이형세포질성을 결정하는 기준에 있어서 부요소를 인지하는 최소 수준(threshold)으로서 대개 10%가 회자되고는 있으나 연구마다 이형세포질성에 대하여 해석하는 기준이 조금씩 상이하여, 부요소의 최소기준의 정의에서부터 최소 대립형질의 뉴클레오티드의 빈도, 최소 coverage, 주변의 연속하는 3염기에 삽입결실이 없는 경우, 한 개체에 여러 개의 이형세포질성 변이가 관찰되면서 새로운 하플로그룹을 형성하는 등의 여러 엄격한 기준을 적용한 정의에 이르기까지 다양한 수준과 범위의 적용기준이 있었다. (표 19 참조) 본 연구에서는 부요소에 대하여 최소 40배 이상의 coverage를 보여주면서 세포핵에 전위된 미토콘드리아 염기서열(numt)도 제외시키고, mtDNA-server를 통하여 신뢰할 수 있는 자료인지 입증된 결과를 이형세포질성 변이로 관찰하였다. 다른 연구에서 발표된 자료와 본 연구의 결과를 직접적으로 비교하는 것은 제한점은 있으나, 본연구 결과의 점이형세포질성 변이에 대한 결과를 다른 연구와 비교하였을 때 전반적으로 유사한 양상을 보여주었다. [표 19] (Holland MM, et al., 2011, Just RS, et al., 2015, Li M, et al., 2010, Skonieczna K, et al., 2015, Sosa MX, et al., 2012, Weissensteiner H, et al., 2016, Zhou Y, et al., 2016)

본 연구에서는 각 개체의 혈액에서 미토콘드리아 DNA 염기서열에서 나타나는 이형세포질성 변이에 대해서 분석하였다. 동일개체의 여러 장기에서 미토콘드리아 DNA 염기서열에 대하여 분석한 다른 연구와 비교하였을 때 본 연구에서처럼 이형세포질성 변이가 염기서열에서 고르지 않고 특정 부위들에 몰려 나타나는 현상은 유사하게 관찰되었다.

다만 이전 연구에 따르면, 특정장기, 특정 대립형질 뉴클레오티드, 연령에 따라 점 이형세포질성의 분포가 다르게 나타나고, 점 이형세포질성의 빈도는 연령, 특정 대립형질 뉴클레오티드와 관련이 있다고 하였다. 한국인에서 점이형세포질성 변이의 양상과 특성을 파악하는데 있어서, 동일개체내 여러 장기 및 혈액에서 나타나는 이형세포질성의 분포와 차이, 이형세포질성 변이의 호발부위 및 특정

대립형질 뉴클레오티드, 연령 분석 등에 대한 연구가 필요할 것이다. (Li M, et al., 2015)

4. 한국인에서 미토콘드리아 DNA 전체염기서열 분석결과와 개체식별력

전체염기서열 분석을 통해 개체식별력을 높일 수 있음을 확인할 수 있었다. 한국인에서 매크로하플로그룹 M(M9;G;D, D, G, M 등)은 주요 하플로그룹이면서, 조절부위 변이로는 하위 하플로그룹 유형 분류에 제한적인 결과를 보여주었기에, 전체염기서열분석을 통해 이들 하플로그룹의 하위 하플로그룹 유형결정이 가능할 것으로 기대하였었다. 연구결과, 공통의 하플로그룹에서 하위 하플로그룹의 분류를 위해서는 전체 염기서열분석을 통해 조절부위뿐만 아니라 암호부위에서 나타나는 변이에 대한 정보는 하플로그룹 세분화 및 재분류에 기여하였을 뿐만 아니라, 하플로그룹에 기여하지 않지만 개체간 차이를 만들어내는 개별변이를 확인할 수 있었다. 하플로타입에 있어서 더 증가된 개수의 고유의 하플로타입을 확인할 수 있었으며 이에 대한 식별력(discriminating capacity) 역시 전체염기서열분석결과 증가한 것을 확인할 수 있었다 (표 10, 그림 8, 그림 9 참조). 따라서 전체염기서열분석은 개체식별에 더 많은 정보를 줄 수 있음을 확인하였다. 또한 조절부위에 근거한 하플로그룹이 전체염기서열분석결과 새로운 하플로그룹으로 재분류될 수 있는 점을 감안하였을 때, 조절부위에 근거하여 분류된 하플로그룹의 정보의 경우 개체식별 해석에 있어서 주의가 필요할 것으로 생각된다. (King JL, et al., 2014, Maruyama S, et al., 2013, Stoljarova M, et al, 2016, Tanaka M, et al, 2004, Zhou Y, et al., 2016)

중국의 한족이나 미국인, 에스토니아인에 대한 연구에서 전체염기서열분석결과 결정된 하플로그룹의 개수와 개체수의 비율은 69~80%를 차지하지만, 한국인에서는 25%로 비교적 낮았다. 하플로타입에서는 한국인(73.7%)과 다른 민족(88~99%)과 거의 유사하였다. 또한 하플로그룹 N과 Y의 경우 전체염기서열 분석결과에도 대부분은 하플로그룹 분류에 변화가 없지만 하플로타입에서는 개체수에 근접한 서로 다른 유형이 관찰되었다. 이러한 양상이 한국인에서의

유전적 특성일 수도 있으나 아마도 본 연구에서 해당 실험대상군의 작은 규모 때문일 수도 있을 것이다. 따라서 앞으로의 연구에서 더 많은 한국인을 대상으로 분석할 필요가 있을 것이다. (King JL, et al., 2014, Maruyama S, et al., 2013, Stoljarova M, et al, 2016, Tanaka M, et al, 2004, Zhou Y, et al., 2016)

개체식별에서 있어서 한국인에서 나타나는 이형세포질성의 특성 등에 대한 정보가 필요하며, 해석에 주의하여야 할 것이다. 본연구에서 확인된 52곳의 점이형세포질성 중 3곳의 점이형세포질성(B4a1c1a np8850, D4a1 np16103, D4a1c np4088)은 고유의 하플로타입을 결정함에 있어서 유일한 차이를 보인 변이여서 별개의 하플로타입으로 구분하기 어려웠다. 또한 동일개체 서로 다른 여러 장기에서 미토콘드리아 DNA염기서열을 분석한 연구에서 여러 장기에서 공통적으로 나타나는 이형세포질성 변이는 유전성 변이로 볼 수 있겠으나 특정장기에서만 나타난다면 체세포돌연변이일 것이므로, 이러한 정의로 접근하였을 때, 관찰된 이형세포질성 변이의 43-65%는 유전성 변이라고 하였다. 본 연구에서 186명의 한국인 중 40개체(21.51%)에서 이형세포질성이 관찰되었는데, 혈액 등의 1종류의 시료에서 실험이 진행되었고, 실험군에 대한 가계도나 유전적 정보는 알 수 없었기 때문에 그 이상의 분석은 어려웠다. 가계도나 유전 관계를 알 수 있고 다양한 연령대를 포함하는 한국인을 대상으로 하여 유전성 변이와 체세포 돌연변이의 분포와 양상, 연령에 의한 이형세포질성 변이의 변화 및 양상에 대한 연구가 필요할 것이다. (Li M, et al., 2015)

결론

본 연구에서 한국인에서 흔하게 나타나는 하플로그룹을 중심으로 186명의 한국인을 선별하여 차세대염기서열분석기법을 적용하여 미토콘드리아 DNA 전체염기서열분석을 시행하여 한국인에서 나타나는 미토콘드리아 DNA의 유전적 특성을 파악할 수 있었다. 미토콘드리아 DNA 전체 염기서열의 조절부위와 암호부위에서 나타나는 변이의 분포는 다른 인종과 유사하였지만, 변이의 위치와 구성은 다른 인종과 차이가 있었지만 동아시아인 특히 중국 한족과는 유사하였다. 하플로그룹 및 하플로타입에 있어서 전체염기서열분석결과 조절부위만을 근거로 하였을 때보다 하플로그룹의 세분화 및 재분류, 증가된 개수의 하플로타입이 확인되었으며, 이러한 경향은 다른 인종에서의 전체염기서열분석결과와 유사하였다. 각 하플로그룹의 양상은 중국의 한족과 유사하였다. 점 이형세포질성의 경우, 각 이형세포질성의 분포와 특성은 다른 인종을 대상으로 한 이형세포질성 연구와 유사한 양상을 보였다. 한국인에서 개체식별력에 있어서는 조절부위만을 근거로 하였을 때보다 하플로그룹이 세분화 및 재분류되고, 개체수에 근접한 하플로타입이 결정되어 개체식별력을 높여줄 수 있음이 확인되었다. 이러한 한국인의 미토콘드리아 DNA의 유전적 다양성은 한국인의 개체식별에 있어서 모계분석 및 여러 민족간 구분에서 중요한 기초자료가 될 뿐만 아니라 한국인에서 여러 주요 질병과 미토콘드리아 DNA의 변이 또는 하플로그룹과의 연관성에 대한 연구에 있어서 기초자료가 될 것으로 본다. 본 연구 결과가 앞으로 한국인에서 미토콘드리아 DNA의 유전적 다양성 및 질병연구에 중요한 견인차 역할을 할 것으로 기대한다.

참고 문헌

Akhmedov AT, Marín-García J. Mitochondrial DNA maintenance: an appraisal. *Mol Cell biochem* 2015;409:283–305.

Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. Molecular biology of the cell, 5th ed. New York: Garland Science; 2008, p27–30.

Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. Molecular biology of the cell, 5th ed. New York: Garland Science; 2008, p856–69.

Allard MW, Wilson MR, Monson KL, Budowle B. Control region sequences for East Asian individuals in the Scientific Working Group on DNA Analysis Methods forensic mtDNA data set. *Leg Med (Tokyo)* 2004;6:11–24.

Anderson S, Bankier AT, Barrell BG, de Bruijin MH, Coulson AR, Drouin J, Eperon IC, Nierlich DP, Roe BA, Sanger F, Schreier PH, Smith AJ, Staden R, Young IG. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. **Nature** 1981;290:457–65.

Andrews RM, Kubacka I, Chinnery PF, Lightowlers RN, Turnbull DM, Howell N. Reanalysis and revision of the Cambridge reference sequence for human mitochondrial DNA. *Nat Genet* 1999;23:147.

Ayala FJ. The myth of Eve: molecular biology of human origins. *Science* 1995;270:1930–6.

Bandelt HJ, Lahermo P, Richards M, Macaulay V. Detecting errors in mtDNA data by phylogenetic analysis. *Int J Legal Med* 2001;115:64–9.

Bandelt HJ, Macaulay V, Richards M. Human mitochondrial DNA and the evolution of Homo sapiens. 1st ed. Germany: SpringerBerlin Heidelberg New York; 2006, 3–46.

Behar DM, van Oven M, Rosset S, Metspalu M, Loogväli EL, Silva NM, Kivisild T, Torroni A, Villems R. A “Copernican” Reassessment of the human mitochondrial DNA tree from its root. *Am J Hum Genet* 2012;90:675–84.

Bendall KE, Macaulay VA, Baker JR, Sykes BC. Heteroplasmic point mutations in the human mtDNA control region. *Am J Hum Genet* 1996;59:1276–87.

Bogenhagen D, Clayton DA. Mouse L cell mitochondrial DNA molecules are selected randomly for replication throughout the cell cycle. *Cell* 1977;11:719–27.

Bogenhagen DF. Mitochondrial DNA nucleoid structure. *Biochim Biophys Acta* 2012;1819:914–20.

Brown WM, Prager EM, Wang A, Wilson AC. Mitochondrial DNA sequence of primates: tempo and mode of evolution. *J Mol Evol* 1982;18:225–39.

Budowle B, Allard MW, Wilson MR, Chakraborty R. Forensics and mitochondrial DNA: applications, debates, and foundations. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2003;4:119–41.

Cann RL, Stoneking M, Wilson AC. Mitochondrial DNA and human evolution. *Nature* 1987;325:31–6.

Chomyn A, Cleeter MW, Ragan CI, Riley M, Doolittle RF, Attardi G. URF6, last unidentified reading frame of human mtDNA, codes for an NADH dehydrogenase subunit. *Science* 1986;234:614–8.

Choung CM, Jang BS, Li Z, Zhang A, Lee YS, Lee JB, Lee SD. Heteroplasmy pattern within D-loop region of mitochondrial DNA in Koreans. *Kor J Legal Med* 2005;29:189–95.

Clayton DA. Structure and function of the mitochondrial genome. *J Inher Metab Dis* 1992;15:439–47.

Coble MD, Just RS, O'Callaghan JE, Letmanyi IH, Peterson CT, Irwin JA, Parsons TJ. Single nucleotide polymorphisms over the entire mtDNA genome that increase the power of forensic testing in Caucasians. *Int J Legal Med* 2004;118:137–46.

Coble MD, Loreille OM, Wadhams MJ, Edson SM, Maynard K, Meyer CE, Niederstätter H, Berger C, Berger B, Falsetti AB, Gill P, Parson W, Finelli LN. Mystery solved: the identification of the two missing Romanov children using DNA analysis. *PLoS One* 2009;4:e4838.

Elson JL, Lightowlers RN Mitochondrial DNA clonality in the dock: can surveillance swing the case? *Trends Genet* 2006;22:603–7.

Fan L, Yao YG. An update to MitoTool: using a new scoring system for faster mtDNA haplogroup determination. *Mitochondrion* 2013;13:360–3.

Fendt L, Zimmermann B, Daniaux M, Parson W. Sequencing strategy for the whole mitochondrial genome resulting in high quality sequences. *BMC Genomics* 2009;10:139.

Garrigan D, Hammer MF. Reconstructing human origins in the genomic era. *Nature Rev Genet* 2006;7:669–80.

Gibbons A. Mitochondrial Eve: Wounded, but not dead yet. *Science* 1992;257:873–5.

Giles RE, Blanc H, Cann HM, Wallace DC. Maternal inheritance of human mitochondrial DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 1980;77:6715–9.

Gonder MK, Mortensen HM, Reed FA, de Sousa A, Tishkoff SA. Whole-mtDNA genome sequence analysis of ancient African lineages. *Mol Biol Evol* 2007;24:757–68.

Greenberg. BD, Newbold JE, Sugino A. Intraspecific nucleotide sequence variability surrounding the origin of replication in human mitochondrial DNA. *Gene* 1983;21:33–49.

Hasegawa M, Di Rienzo A, Kocher TD, Wilson AC. Toward a more accurate time scale for the human mitochondrial DNA tree. *J Mol Evol* 1993;37:347–54.

Hauswirth WW, Laipis PJ. Mitochondrial DNA polymorphism in a maternal lineage of Holstein cows. *Proc Natl Acad Sci USA* 1982;79:4686–4690.

Hayashida K, Omagari K, Masuda JI, Hazama H, Kadokawa Y, Ohba K, Kohno S. The sperm mitochondria-specific translocator has a key role in maternal mitochondrial inheritance. *Cell Biol int* 2005;29:472–81.

Heather JM, Chain B. The sequence of sequencers: The history of sequencing DNA. *Genomics* 2016;107:1–8.

Holland MM, Parsons TJ. Mitochondrial DNA Sequence Analysis – Validation and Use for Forensic Casework. *Forensic Sci Rev* 1999;11:21–50.

Holland MM, McQuillan MR, O'Hanlon KA. Second generation sequencing allows for mtDNA mixture deconvolution and high resolution detection of heteroplasmy. *Croat Med J* 2011;52:299–

313.

Hong SB, Kim KC, Kim W. Mitochondrial DNA haplogroups and homogeneity in the Korean population. *Genes Genom* 2014;36:583–90.

Jin HJ, Kwak KD, Hong SB, Shin DJ, Han MS, Tyler–Smith C, Kim W. Forensic genetic analysis of mitochondrial DNA hypervariable region I/II sequences: an expanded Korean population database. *Forensic Sci Int* 2006;158:125–30.

Jin HJ, Tyler–Smith C, Kim W. The Peopling of Korea Revealed by Analysed of Mitochondrial DNA and Y–Chromosomal Markers. *PLos One* 2009;4:e4210.

Just RS, Scheible MK, Fast SA, Sturk–Andreaggi K, Röck AW, Bush JM, Higginbotham JL, Peck MA, Ring JD, Huber GE, Xavier C, Strobl C, Lyons EA, Diegoli TM, Bodner M, Fendt L, Kralj P, Nagl S, Niederwieser D, Zimmermann B, Parson W, Irwin JA. Full mtGenome reference data: development and characterization of 588 forensic–quality haplotypes representing three U.S. populations. *Forensic Sci Int Genet* 2015a;14:141–155.

Just RS, Irwin JA, Parson W. Mitochondrial DNA heteroplasmy in the emerging field of massively parallel sequencing. *Forensic Sci Int Genet* 2015b;18:131–9.

King JL, LaRue BL, Novroski NM, Stoljarova M, Seo SB, Zeng X, Warshauer DH, Davis CP, Parson W, Sajantila A, Budowle B. High–quality and high–throughput massively parallel sequencing of the human mitochondrial genome using the Illumina MiSeq. *Forensic Sci Int Genet* 2014;12:128–35.

Kivisild T, Tolk HV, Parik J, Wang Y, Papiha SS, Bandelt HJ, Villems R. The emerging limbs and twigs of the East Asian mtDNA

tree. *Mol Biol Evol* 2002;19:1737–51.

Koehler CM, Lindberg GL, Brown DR, Beitz DC, Freeman AE, Mayfield JE, Myers AM. Replacement of bovine mitochondrial DNA by a sequence variant within one generation. *Genetics* 1991;129:247–55.

Kong QP, Yao YG, Sun C, Bandelt HJ, Zhu CL, Zhang YP. Phylogeny of east Asian mitochondrial DNA lineages inferred from complete sequences. *Am J Hum Genet* 2003;73:671–6.

Kong QP, Yao YG, Liu M, Shen SP, Chen C, Zhu CL, Palanichamy MG, Zhang YP. Mitochondrial DNA sequence polymorphisms of five ethnic populations from northern China. *Hum Genet* 2003;113:391–405.

Kong QP, Bandelt HJ, Zhao M, Zhang Y, Yao Y. Reply to van Oven: suggestion and caveats for naming mtDNA haplogroup. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2010;107:E40–1.

Lee HY, Yoo JE, Park MJ, Chung U, Kim CY, Shin KJ. East Asian mtDNA haplogroup determination in Koreans: haplogroup–level coding region SNP analysis and subhaplogroup–level control region sequence analysis. *Electrophoresis* 2006;27:4408–18.

Lee HY, Yoo JE, Park MJ, Chung U, Shin KJ. Mitochondrial DNA control region sequences in Koreans: identification of useful variable sites and phylogenetic analysis for mtDNA data quality control. *Int J Legal Med* 2006;120:5–14.

Lee SD, Lee YS, Lee JB. Polymorphism in the mitochondrial cytochrome B gene in Koreans. An additional marker for individual identification. *Int J Legal Med* 2002;116:74–8.

Li M, Schönberg A, Schaefer M, Schroeder R, Nasidze I, Stoneking

M. Detecting heteroplasmy from high-throughput sequencing of complete human mitochondrial DNA genomes. *Am J Hum Genet* 1020;87:237–49.

Li M, Schrönder R, Shengyu Ni, Madea B, Stoneking M. Extensive tissue-related and allele-related mtDNA heteroplasmy suggests positive selection for somatic mutations. *Proc Natl Acad Sci USA* 2015;112:2491–6.

Lopez JV, Yuhki N, Masuda R, Modi W, O'Brien SJ. Numt, a recent transfer and tandem amplification of mitochondrial DNA to the nuclear genome of the domestic cat. *J Mol Evol* 1994;39:174–90.

Lutz-Bonengel S, Schmidt U, Schmitt T, Pollak S. Sequence polymorphisms within the human mitochondrial genes MTATP6, MTATP8, and MTND4. *Int J Legal Med* 2003;117:133–42.

Maruyama S, Komuro T, Izawa H, Tsutsumi H. Analysis of human mitochondrial DNA polymorphisms in the Japanese population. *Biochem Genet* 2013;51:33–70.

Metzker ML. Sequencing technologies — the next generation. *Nat Rev Genet* 2010;11:31–46.

Moraes CT, Srivastava S, Kirkinezos I, Oca-Cossio J, van Waveren C, Woischnick M, Diaz F. Mitochondrial DNA structure and function. *Int Rev Neurobiol* 2002;53:3–23.

Nilsson M, Andréasson-Jansson H, Ingman M, Allen M. Evaluation of mitochondrial DNA coding region assays for increased discrimination in forensic analysis. *Forensic Sci Int Genet* 2008;2:1–8.

Parsons TJ, Muniec DS, Sullivan K, Woodyatt N, Alliston-Greiner R, Wilson MR, Berry DL, Holland KA, Weedn VW, Gill P, Holland MM.

A high observed substitution rate in the human mitochondrial DNA control region. *Nat Genet* 1997;15:363–8.

Parsons TJ, Holland MM. Mitochondrial mutation rate revisited: hot spots and polymorphisms — Reply. *Nat Genet* 1998;18:109–10.

Parsons TJ, Coble MD. Increasing the forensic discrimination of mitochondrial DNA testing through analysis of the entire mitochondrial DNA genome. *Croat Med J* 2001;42:304–9.

Parson W, Strobl C, Huber G, Zimmermann B, Gomes SM, Souto L, Fendt L, Delpont R, Langit R, Wootton S, Lagacé R, Irwin J. Evaluation of next generation mtGenome sequencing using the Ion Torrent Personal Genome Machine (PGM). *Forensic Sci Int Genet* 2013;7:543–9.

Parson W, Gusmão L, Hares DR, Irwin JA, Mayr WR, Morling N, Pokorak E, Prinz M, Salas A, Shneider PM, Parsons TJ. DNA commission of the international society for forensic genetics; revised and extended guidelines for mitochondrial DNA typing. *Forensic Sci Int Genet*. 2014;13:134–42.

Parson W, Huber H, Moreno L, Madel MB, Bradhagen MD, Nagl S, Xavier C, Eduardoff M, Callaghan TC, Irwin JA. Massively parallel sequencing of complete mitochondrial genomes from hair shaft samples. *Forensic Sci Int Genet* 2015;15:8–15.

Poulton J, Turnbull DM. 74[±] Enmc international workshop; mitochondrial diseases. *Neuromuscul Disord* 2000;10:460–2.

Quail MA, Smith M, Coupland P, Otto TD, Harris SR, Connor TR, Bertoni A, Swerdlow HP, Gu Y. A tale of three next generation sequencing platforms: comparison of Ion Torrent, Pacific Biosciences and Illumina MiSeq sequencers. *BMC Genomics* 2012;13:341.

Redd AG, Takezaki N, Sherry ST, McGarvey ST, Sofro ASM, Stoneking M. Evolutionary history of the COII/tRNA^{Lys} intergenic 9 base pair deletion in human mitochondrial DNAs from the Pacific. *Mol Biol Evol* 1995;12:604–15.

Richards MB, Macaulay VA, Bandelt HJ, Sykes BC. Phylogeography of mitochondrial DNA in western Europe. *Ann Hum Genet* 1998;62:241–60.

Rosenthal CK, Heinrichs A, Gray N, Rusk N, Baumann Kim, van Ooij C, Rosenthal CK, Schuldt A, Chenette EJ, Doerr A, Grisendi S, Tonzani S, Whalley K, Le Bot N, David R, Evanko D, Swaminathan S, Wrighton KH, Cesari F, de Souza N. Nature milestones in Light microscopy. 2009 Macmillan Publishers S6–S22.

Rothberg JM, Hinz W, Rearick TM, Schultz J, Mileski W, Davey M, Leamon JH, Johnson K, Milgrew MJ, Edwards M, Hoon J, Simons JF, Marran D, Myers JW, Davidson JF, Branting A, Nobile JR, Puc BP, Light D, Clark TA, Huber M, Branciforte JT, Stoner IB, Cawley SE, Lyons M, Fu Y, Homer N, Sedova M, Miao X, Reed B, Sabina J, Feierstein E, Schorn M, Alanjary M, Dimalanta E, Dressman D, Kasinskas R, Sokolsky T, Fidanza JA, Namsaraev E, McKernan KJ, Williams A, Roth GT, Bustillo J. An integrated semiconductor device enabling non-optical genome sequencing. *Nature* 2011;475:348–52.

David C. Samuels,¹ Andrew D. Carothers,² Robin Horton,³ and Patrick F. Chinnery. The power to detect Disease associations with mitochondrial DNA haplogroups. *Am J Hum Genet* 2006;78:713–20.

Sato M. Sato K. Maternal inheritance of mitochondrial DNA by diverse mechanisms to eliminate paternal mitochondrial DNA. *Biochim Biophys Acta* 2013;1833:1979–84.

Scheffler IE. Mitochondria. 2nd ed. Hoboken, New Jearsy. John

Wiley & Sons, Inc, Hoboken, New Jersey. 2008.

Schwartz M, Vissing J. Paternal inheritance of mitochondrial DNA. *N Engl J Med* 2002;347:576–80.

Seo SB, Zeng X, King JL, Larue BL, Assidi M, Al-Qahtani MH, Sajantila A, Budowle B. Underlying Data for Sequencing the Mitochondrial Genome with the Massively Parallel Sequencing Platform Ion Torrent™ PGM™. *BMC Genomics* 2015;16 Suppl 1:S4.

Seo Y, Uchiyama T, Shimizu K, Takahama K. Identification of remains by sequencing of mitochondrial DNA control region. *Am J Forensic Med Pathol* 2000;21:138–43.

Shendure J, Mitra RD, Varma C, Church GM. Advanced sequencing technologies: methods and goals. *Nat Rev Genet* 2004;5:335–44.

Schendure J, Ji H. Next-generation DNA sequencing. *Nat Biotechnol* 2008;26:1135–45.

Skonieczna K, Malyarchuk B, Jawień A, Marszałek A, Banaszkiewicz Z, Jarmocik P, Borcz M, Bała P, Grzybowski T. Heteroplasmic substitutions in the entire mitochondrial genomes of human colon cells detected by ultra-deep 454 sequencing. *Forensic Sci Int Genet* 2015;15:16–20.

Sosa MX1, Sivakumar IK, Maragh S, Veeramachaneni V, Hariharan R, Parulekar M, Fredrikson KM, Harkins TT, Lin J, Feldman AB, Tata P, Ehret GB, Chakravarti A. Next-generation sequencing of human mitochondrial reference genomes uncovers high heteroplasmy frequency. *PLoS Comput Biol* 2012;8:e1002737.

Stewart JB, Chinnery PF. The dynamics of mitochondrial DNA heteroplasmy: implications for human health and disease. *Nat Rev Genet* 2015;16:530–42.

Stoljarova M, King JL, Takahashi M, Aaspõllu A, Budowle B. Whole mitochondrial genome genetic diversity in an Estonian population sample. *Int J Legal Med* 2016;130:67–71.

Tanaka M, Cabrera VM, González AM, Larruga JM, Takeyasu T, Fuku N, Guo LJ, Hirose R, Fujita Y, Kurata M, Shinoda K, Umetsu K, Yamada Y, Oshida Y, Sato Y, Hattori N, Mizuno Y, Arai Y, Hirose N, Ohta S, Ogawa O, Tanaka Y, Kawamori R, Shamoto–Nagai M, Maruyama W, Shimokata H, Suzuki R, Shimodaira H. Mitochondrial genome variation in Eastern Asia and the peopling of Japan. *Genome Res* 2004;14:1832–1850.

Templeton JE, Brotherton PM, Llamas B, Soubrier J, Haak W, Cooper A, Austin JJ. DNA capture and next–generation sequencing can recover whole mitochondrial genomes from highly degraded samples for human identification. *Investig Genet* 2013;4:26.

Titford M. The long history of hematoxylin. *Biotech Histochem* 2005;80:73–8.

Torroni A, Schurr TG, Cabell MF, Brown MD, Neel JV, Larsen M, Smith DG, Vullo CM, Wallace DC. Asian affinities and continental radiation of the four founding native American mtDNAs. *Am J Hum Genet* 1993;53:563–90.

Underhill PA, Kivisild T. Use of Y chromosome and mitochondrial DNA population structure in tracing human migrations. *Annu Rev Genet* 2007;41:539–564.

van Oven M, Kayser M. Updated phylogenetic tree of global human mitochondrial DNA variation. *Hum Mutat* 2009;30:E386–94.

van Oven M. Revision of the mtDNA tree and corresponding haplogroup nomenclature. *Proc Natl Acad Sci* 2010;107:E38–9.

Vigilant L, Stoneking M, Harpending H, Hawkes K, Wilson AC. African populations and the evolution of human mitochondrial DNA. *Science* 1991;253:1503–7.

Wakeley J. Substitution rate variation among sites in hypervariable region 1 of human mitochondrial DNA. *J Mol Evol* 1993;37:613–23.

Wallace DC. Mitochondrial DNA variation in human evolution, degenerative disease, and aging. *Am J Hum Genet* 1995;57:201–23.

Weissensteiner H, Pacher D, Kloss–Brandstätter A, Forer L, Specht G, Bandelt HJ, Kronenberg F, Salas A, Schönherr S. HaploGrep 2: mitochondrial haplogroup classification in the era of high–throughput sequencing. *Nucleic Acids Res* 2016a;44:W58–W63.

Weissensteiner H, Forer L, Fuchsberger C, Schöpf B, Kloss–Brandstätter A, Specht G, Kronenberg F, Schönherr S. mtDNA–Server: next–generation sequencing data analysis of human mitochondrial DNA in the cloud. *Nucleic Acids Res* 2016b;44:W64–9.

Wills C. When did Eve live? An evolutionary detective story. *Evolution* 1995;49:593–607.

Woischnik M, Moraes CT. Pattern of organization of human mitochondrial pseudogenes in the nuclear genome. *Genome Res* 2002;12:885–93.

Yao YG, Kong QP, Bandelt HJ, Kivisild T, Zhang YP. Phylogeographic differentiation of mitochondrial DNA in Han Chinese. *Am J Hum Genet* 2002;70:635–51.

Zhou Y, Guo F, Yu J, Liu F, Zhao J, Shen H, Zhao B, Jia F, Sun Z, Song H, Jiang X. Strategies for complete mitochondrial genome

sequencing on Ion Torrent PGM™ platform in forensic sciences.
Forensic Sci Int Genet 2016;22:11–21.

Abstract

Entire Mitochondrial DNA Sequencing on Next Generation Sequencing For the Korean Population

Sohyung Park

Department of Forensic Medicine

The Graduate School

Seoul National University

Mitochondria DNA (mtDNA) sequencing is an important analytic tool in understanding the genetic diversity that has been used for forensic identification as well as understanding the origin of humans in the phylogenetic study. Due to cost and time limitation, the traditional mtDNA sequencing analysis was usually focused on the control region. As a result, the information of the genetic diversity had to be limited. In the wake of Human Genome Project, in order to handle the enormous amount of the genetic data, the need for a new analytic technology arose and the next generation sequencing was born. Thanks to this advanced technique, the complete mtDNA sequencing could be available at a lower cost for less time, which allowed for an easier access to the information of genetic diversity – previously unavailable using the traditional method. Since then there have been many researches for mtDNA genetic diversity in various people using this new analytic approach. And it is expected that it will strengthen the power of forensic identification based on

the genetic diversity on the complete mtDNA sequencing. In terms of Koreans, most of the previous mtDNA data were usually focused on the control region, such that the information of the genetic diversity in Korean was limited. Therefore, in keeping with research trends, it is necessary to study the genetic diversity in Korean based on complete mtDNA sequences, using next generation sequencing. The purpose of this study is to understand the Korean genetic diversity of the mtDNA by whole mtDNA sequencing, and to confirm that it will strengthen the power of forensic identification in Koreans. 186 Koreans with common haplogroups in Korea based on the control region of mtDNA were retrieved, and whole mtDNA sequencing using Ion Torrent Personal Genome Machine was performed on them. As a result, compared to people in East Asia including China, and other people in other continents, distribution of homoplasmic variants and point heteroplasmy of mtDNA in Korean was generally similar to each other. Common variants between Korean and East Asia were similar, but they were different when compared to those of people in other continents. For haplogroup classification, and haplotypes determination, whole mtDNA sequencing revealed better assignments compared to those based on the control region of mtDNA, and some were reassigned into new haplogroups. These new assignments were also revealed similarly in people in other countries. Given that the macrohaplogroup M (D, G, M) is major haplogroup in East Asians including Koreans, the complete mtDNA sequencing is necessary to understand the genetic diversity, furthermore, the previous data focused on the control region might be incomplete. In addition, the result that the numbers of haplotypes were close to those of individuals after whole mtDNA sequencing in

Korean, also contributed in strengthening the power of forensic identification. Also, the private variants in the same haplogroups and the fewer numbers of haplogroups than those of individuals, might suggest the possibility of some new potent subhaplogroups in Korean. Point heteroplasmy was also identified in Korean mtDNA, and its distribution was similar to other studies. This study would be the driving force in understanding the genetic diversity of mtDNA in Koreans in the future.

Keywords: Forensic identification, Mitochondria, Mitochondrial DNA, Next generation sequencing, Korean
Student Number : 2012–30549

표

[표 1] 186명의 한국인에서 나타나는 하플로그룹 분포구성

하플로그룹	N	빈도(%)	참고문헌
D4a	40		Allard et al. 2004; Lee et al. 2006; Jin et al. 2009
D4a3	3	27.96	Lee et al. 2006
D4b1	6		Lee et al. 2006
D5b	3		Lee et al. 2006
A5a	20	10.75	Lee et al. 2006; Jin et al. 2009
M7a1	9	10.22	Kivisild et al. 2002; Allard et al. 2004; Underhil et al. 2007; Jin et al. 2009
M7b1	10		Lee et al. 2006
F1b1	16	8.60	Lee et al. 2006
G1a1	19	10.22	Tanaka et al. 2004; Lee et al. 2006
B4a	16	10.75	Lee et al. 2006; Jin et al. 2009
B4c1c	4		Lee et al. 2006
N9a2a	11	5.91	Tanaka et al. 2004; Lee et al. 2006
M9;G;D	17	9.14	Lee et al. 2006; Jin et al. 2009
Y1	12	6.45	Lee et al. 2006; Jin et al. 2009; Hong et al. 2014
total	186	100	

N, 각 군의 해당 시료의 숫자

[표 2] 186명의 한국인의 인구학적 특성

하플로그룹	N	지역정보			성별		
		지역		모름	남	여	모름
D4a	40	서울	2				
		제주	15	23	19	14	7
D4a3	3	제주	3	0	2	1	0
D4b1	6	제주	6	0	6	0	0
D5b	3	—	—	3	0	0	3
A5a	20	제주	10	10	10	4	6
M7a1	9	제주	3	6	4	2	3
M7b1	10	제주	2	8	8	0	2
F1b1	16	제주	2	14	6	3	7
G1a1	19	서울	1				
		제주	9	9	10	7	2
B4a	16	제주	4	12	9	3	4
B4c1c	4	제주	4	0	2	2	0
N9a2a	11	부산	1				
		제주	2	8	3	3	5
M9;G;D	17	—	—	17	4	6	7
Y1	12	제주	2	10	2	7	3
total	186		66	120	85	52	49

N, 각 군의 해당 시료의 숫자

[표 3] 미토콘드리아 DNA 전체 염기서열분석을 위한 길잡이 (Fendt L, et al., 2009)

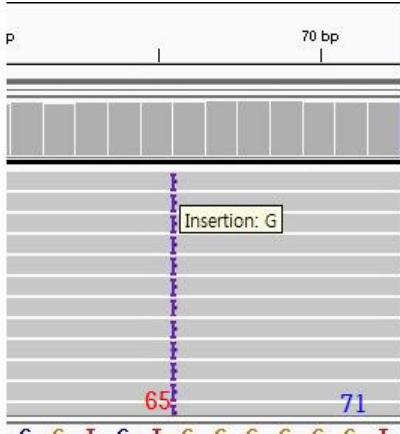
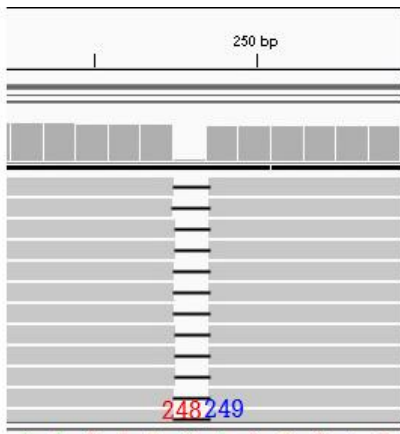
미토콘드리아 DNA 전체 염기서열을 분석하기 위하여, 미토콘드리아 DNA 염기서열을 두 부분으로 나누고, 각 부분은 양 끝부분 일부가 서로 중복되게 하여 크기가 약 8500 kb가 되도록 한다. 뉴클레오티드 2499번에서 10837번 사이의 염기서열부분을 A부분으로 지정하고, 10672번에서 2669번 사이의 염기서열부분을 B부분으로 지정한 후, 각 부분 5'끝부분에서 해당 염기서열 부위에 상보적으로 부합하는 길잡이를 제작하여 DNA 증폭을 시행하였으며, 각 길잡이 서열은 다음과 같다.

	이름	염기서열 5'	해당부분
PCR	FampA	AAATCTTACCCCGCCTGTTT	A 부분
PCR	RampA	AATTAGGCTGTGGGTGGTTG	A 부분
PCR	FampB	GCCATACTAGTCTTTGCCGC	B 부분
PCR	RampB	GGCAGGTCAATTTCACTGGT	B 부분

[표 4] 변이검출형식보고서(VCF)에서 오검출된 변이

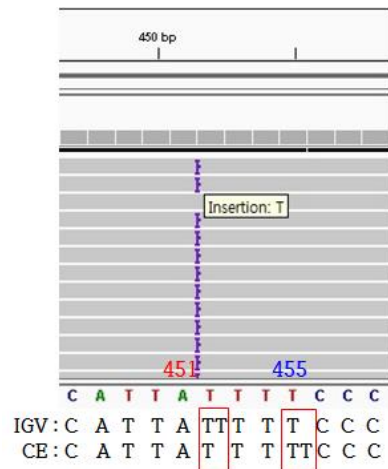
변이검출 (Variant caller)	분석	해당 변이가 포함된 하플로그룹	변이의 전체수
보고 안됨	71.1G	B4a	3
247GA → 247G	249del	F1b1	16
보고 안됨	455.1T	D4	3
513GCA → 513G	523-524del	A5a, B4a, D4b, F1b1, G1a1, M7a1, M9;G;D	73
보고 안됨	573.1C	A5a, M9;G;D	3
보고 안됨	960.1C	N9a2a	11
2150T → 2150TA	2156.1A	A5a	20
4246ATT → AT,ATC	4248C	A5a	20
5894A → 5894AC	5899.1C	M7a1	9
8270CACCCCCTCT → 8270C	8281- 8289del	B4a, B4c	20
9540C or 9540T/C	9540C	D4	11
보고 안됨	16182C, 16183C	B4, F1b1, M7b, D5b	40

[표 5] IGV를 이용한 오검출된 변이 검토

변이검출 (Variant caller)	분석	IGV로 검토
보고 안됨	71.1G (CE)	 <p>IGV: C G T C T G G G G G G T CE: C G T C T G G G G G G T</p>
247GA → 247G	249del (CE)	 <p>IGV: A A T T G - A T G T C T CE: A A T T G A - T G T C T</p>

보고 안됨

455.1T
(CE)

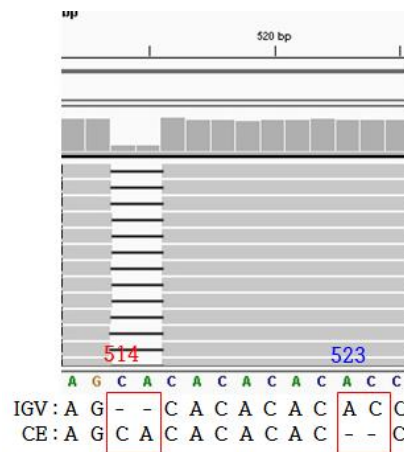


513GCA

→ 523-

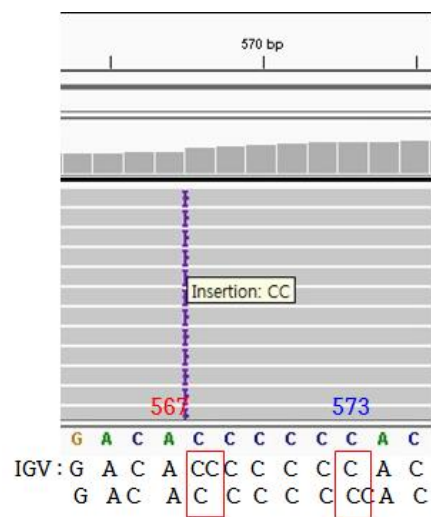
513G

524del

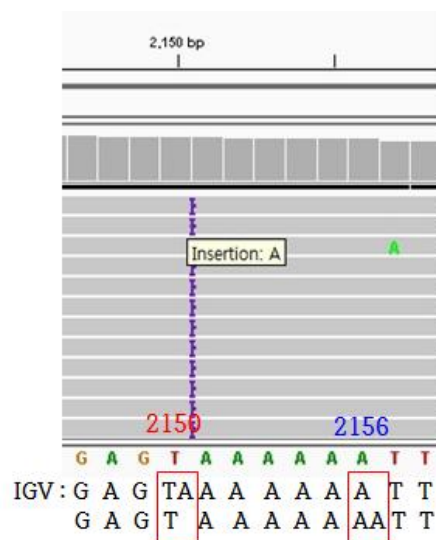


보고 안됨

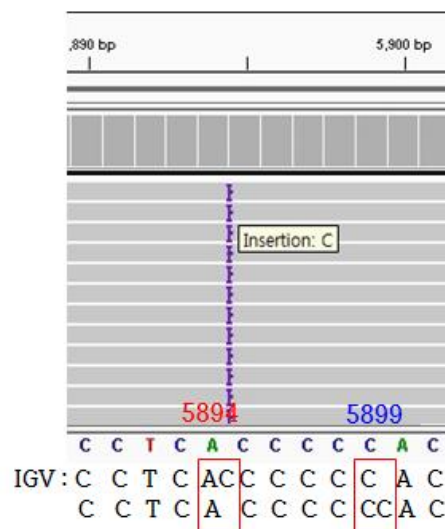
573.1C
(CE)



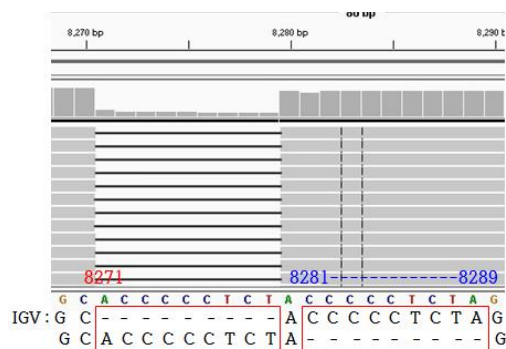
2150T → 2156.1A
 2150TA (Mt DB)



5894A → 5899.1C
 5894AC (Mt DB)



8270CACCC
 CCTCT → 8270C
 8281-
 8289del



[표 6] 미토콘드리아 DNA의 조절부위와 암호부위 및 전체에서 나타난 동형세포질성 변이(homoplasmy variants)의 분포

하플로그룹	조절부위		암호부위		전체 미토콘드리아 DNA		암호부위 :조절부위
	N	%	N	%	N	%	비율
D4a, D4a3, D4b1, D5b	446	22.32	1552	77.68	1998	100	3.48
A5a	168	27.50	443	72.50	611	100	2.64
M7a1, M7b1	168	21.71	606	78.29	774	100	3.61
F1b1	212	34.81	397	65.19	609	100	1.87
G1a1	171	22.35	594	77.65	765	100	3.47
B4a, B4c1c	204	39.77	309	60.23	513	100	1.51
N9a2a	97	32.44	202	67.56	299	100	2.08
M9;G;D	101	17.88	464	82.12	565	100	4.59
Y1	115	31.86	246	68.14	361	100	2.14
Total	1682	25.90	4813	74.10	6495	100	2.86
N, 해당 시료의 수							

[표 7] 하플로그룹에 따른 개별변이 분포

하플로그룹 (전체염기서열)	N	변이
D4a1	2	14926G
D4b1a1	6	4113A, 4646C
D4d	2	6524C
A5a	2	5250
A5a1a	2	8619T
F1b1a2	2	3395G
G1a1a	2	9254G
G1a1a	2	9410G
G1a1a	2	9494G
G1a1a1	6	1822C, 9854C
B4a	4	15926T
B4+16261	2	6863G
B4a1c1a	2	8595T
N9a2a	3	3866C
Y1	2	9254G

N: 개체수

[표 8] 전체 미토콘드리아 DNA 변이에 따른 하플로그룹 세분화 양상

조절부위 (N)	전체 미토콘드리아 DNA (N)
D4a (40)	D4a (3), D4a1 (11), D4a1a1 (2), D4a1b (10), D4a1c (4), D4a2 (8), D4a2a (1), D4f1 (1)
D4a3 (3)	D4a3b (3)
D4b1 (6)	D4b1a1 (6)
D5b (3)	D5b1b (3)
A5a (20)	A5a (6), A5a1a (11), A5a1a1 (1), A5a1a2 (1), A5a3 (1)
M7a1 (9)	M7a1a (4), M7a1a1 (1), M7a1a5a (1), M7a1a9 (3)
M7b1 (10)	M7b1a1a (1), M7b1a1a1 (9)
F1b1 (16)	F1b1a (1), F1b1a1 (4), F1b1a1a (4), F1b1a1a1 (1), F1b1a1a2 (2), F1b1a2 (4)
G1a1 (19)	G1a1a (11), G1a1a1 (8)
B4a (16)	B4a (4), B4+16261 (2), B4a1c1a (4), B4a1c1a1 (6)
B4c1c (4)	B4c1c (4)
N9a2a (11)	N9a2a (10), N9a2a2 (1)
M9;G;D (17)	D4b2a2 (1), D4d (4), D4e2 (2), D4e2a (2), D4f1 (3), D4j (5)
Y1 (12)	Y1 (9), Y1a (1), Y1b1 (1), Y1b1a (1)
Total (186)	186
N, 해당 시료의 수	

[표 9] 하플로그룹을 결정하는 주요 변이

하플로그룹	미토콘드리아 DNA 주요 변이
L1' 2' 3' 4' 5' 6	<u>C146T</u> <u>C182T</u> T4312C T10664C C10915T A11914G G13276A <u>G16230A</u>
L2' 3' 4' 5' 6	<u>C152T</u> A2758G C2885T G7146A T8468C
L2' 3' 4' 6	<u>C195T</u> <u>A247G</u> A825t T8655C A10688G C10810T G13105T T13506C G15301A A16129G <u>T16187C</u> <u>C16189T</u>
L3' 4' 6	G4104A A7521G
L3' 4	<u>T182C!</u> T3594C T7256C T13650C <u>T16278C</u>
L3	A769G A1018G <u>C16311T</u>
M	<u>T489C</u> C10400T T14783C G15043A
M7	C6455T T9824C
M7a	T2626C C2772T T4385C A4958G G12771A, <u>T16209C</u> <u>T16324</u>
M7a1	5899.XC G14364A
M7a1a	T11017C A11084G
M7a1a1	T11722C
M7a1a5a	T13768C G7852A
M7a1a9	G4048A
M7b' c	C4071T
M7b	C12405T
M7b1	A5351G G5460A T7684C G7853A <u>G16129A!</u>
M7b1a1a	<u>T199C</u> G4048A A4164G T6680C

	<u>T16297C</u>	
	C150T T12811C	<u>T16189C!</u>
M7b1a1a1	T10345C <u>T16298C</u>	
M9	G4491A <u>T16362C</u>	
M12' G	G14569A	
G	G709A A4833G T5108C <u>T16362C</u>	
G1	T8200C G15323A G15497A	
G1a	<u>C150T</u> C7867T	
G1a1	A15860G <u>T16325C</u>	
G1a1a	A4793G G11914A!	
G1a1a1	A827G	
M80' D	C4883T	
D	C5178a <u>T16362C</u>	
D4	G3010A C8414T C14668T	
D4a	<u>T152C!</u> C3206T T8473C T14979C <u>G16129A!</u>	
D4a1	T10410C	
D4a1a1	G5261A G15314A	
D4a1b	A13651G	
D4a1c	A7822G	
D4a2	T12957C	
D4a2a	G3531A A8296G A10005G	
D4a3	A5466G T16249C	
D4a3b	G7912A	
D4b	G8020A	
D4b1	C10181T T15440C A15951G <u>G16319A</u>	
D4b1a1	A14927G	

	<u>T152C!</u>	A2246G	T8450C
	A13827G	A14091G	G15217A
	A15805G		
D4b2	A1382c	C8964T	T9824a
D4b2a2	A15524G		G8251A
	C10104T		
D4d	<i>T3593C</i>	<i>A5539G</i>	<i>A6503c</i>
	<i>G7757A</i>	<i>T9938C</i>	<i>C12085T</i>
	<i>T13879C</i>	<u><i>G16319A</i></u>	
D4e	C11215T		
D4e2	A15874G		
D4e2a	573.XC	A13716G	
D4f	T7270C		
D4f1	G2706A	C4538T	G8764A
	T11255C		
D4j	G11696A		
D5	<u>T16189C!</u>	<u>C150T</u>	T1107C
	A5301G	A10397G	
D5a' b	A9180G		
D5b	<u>C456T</u>	T681C	C1048T
	A5153G		
	A15724G		
D5b1b	T6253C	A3759G	
N		G8701A	C9540T
		G10398A	
		C10873T	A15301G!
N9		G8417A	
N9a	<u>C150T</u>	G5231A	A12358G
	G12372A	<u>C16257a</u>	<u>C16261T</u>
N9a2' 4' 5	<u>T16172C</u>		
N9a2	T961C	T15067C	
N9a2a	<u>A16497G</u>		
N9a2a2	A14148G		

Y	G8392A A10398G! T14178C A14693G <u>T16126C</u> <u>T16223C</u> <u>T16231C</u>
Y1	<u>T146C!</u> G3834A <u>(C16266T)</u>
Y1a	A7933G <u>T16189C!</u>
Y1b1	A10097G C15460T G15221A
Y1b1a	C9278T
A	<u>A235G</u> A663G A1736G T4248C A4824G C8794T <u>C16290T</u> <u>G16319A</u>
A5	A8563G C11536T
A5a	2156.1A G4655A C11647T <u>C16187T!</u>
A5a1a	C14944T G10801A
A5a1a1	G5773A T12880C
A5a1a2	C8628T
A5a3	A12909G
R	T12705C <u>T16223C</u>
R9	C3970T G13928c <u>T16304C</u>
F	A249d T6392 G10310A
F1	G6962A T10609C G12406A C12882T
F1b	<u>T16189C!</u> <u>T152C!</u> C10976T C12633T G14476A <u>C16232a</u> <u>T16249C</u> <u>T16311C!</u>
F1b1	A4732G G5147A
F1b1a	<u>G16129A!</u> <u>C16344T</u>
F1b1a1	A15954G
F1b1a1a	C5049T

	F1b1a1a1	T4705C	
	F1b1a1a2	A9389G	
	F1b1a2	C14629T	
R	B	<u>T16189C!</u>	8281-8189d
	B4	<u>T16217C</u>	
	B4+16261	<u>C16261T</u>	
	B4a	<u>C16261T</u>	T5465C G9123A
	B4a1	T10238C	
	B4a1c	G709A	
	B4a1c1a	A9254G	C15292T
	B4a1c1a1	<u>G73c</u> <u>T89C</u>	
	B4c	T1119C G15346A	
	B4c1	C3497C	
	B4c1c	<u>C150T</u> <u>T195C!</u>	A5441G
		A10398G! A13629G T15941C	

!: 계통발생학적으로 조상의 뉴클레오티드로 back mutation

()는 개별 하플로그룹내에서 자주 나타나는 변이지만 주요 변이로는 아직 불확실한 변이

이탈릭체로 표시된 변이는 예비 분류로 추가적인 염기서열정보로서 개정될 수 있음.

삽입은 “.”으로, 결실은 “d”로 표시되었음.

밑줄: 조절부위의 변이

(Behar DM, et al., 2012, van Oven M, et al., 2009)

[표 10] 하플로타입의 양상

하플로그룹(N)	고유한 하플로타입 수		Discriminating Capacity (%)	
	조절부위	전체염기서열	조절부위	전체염기서열
D4a (40)	11	26	27.5	65.0
D4a3 (3)	1	3	33.3	100.0
D4b1 (6)	1	2	16.7	33.3
D5b (3)	2	3	66.7	100.0
A5a (20)	12	14	60.0	70.0
M7a1 (9)	2	8	22.2	88.9
M7b1 (10)	6	10	60.0	100.0
F1b1 (16)	2	11	12.5	68.8
G1a1 (19)	8	13	42.1	68.4
B4a (16)	8	11	50.0	68.8
B4c1c (4)	1	1	25.0	25.0
N9a2a (11)	3	9	27.3	81.8
M9;G;D (17)	7	15	41.2	88.2
Y1 (12)	6	9	50.0	75.0
전체 (186)	70	135	37.6	72.7

[표 11] 이형세포질성 변이의 분석

하플로그룹		부요소 Coverage	수준(%)	위치	rCRS 주요소 부요소		
1	F1b1a1a	40.8	0.61	2561	T	T	C
		75.8	1.02	2644	A	A	G
2	D4e2a	64.0	6.05	10503	T	T	C
		69.3	0.78	2561	T	T	C
3	D4a1b	55.0	1.12	2552	T	T	C
4	D4a	51.9	2.18	2844	G	G	A
		54.0	2.76	5973	G	G	A
		56.0	4.82	16126	T	T	C
5	N9a2a	45.0	2.21	12868	G	G	A
6	M7a1a5a	62.0	2.45	1425	T	T	C
7	B4+16261	50.0	2.70	6892	G	G	A
8	B4a	43.0	2.73	9618	C	C	A
9	G1a1a	276.6	2.77	2580	T	T	C
		135.1	7.30	7606	A	A	G
10	A5a1a	47.0	2.79	16094	T	C	T
11	B4a1c1a1	45.0	3.10	16092	T	T	C
12	D4a1b	48.0	3.12	990	T	T	C
13	N9a2a	44.0	3.66	9137	T	T	C
		69.0	4.32	11884	A	G	A

14	B4a1c1a1	85.0	3.79	93	A	A	G
15	D4f1	89.1	4.74	6261	G	G	A
16	N9a2a2	45.0	4.98	896	A	A	G
		50.0	7.23	16129	G	G	A
17	D4a1c	132.0	5.11	114	C	C	T
18	D4a1	96.0	5.68	16103	A	A	G
19	D4a1	113.0	7.81	9457	T	T	C
20	D4j	45.0	8.3	4710	T	T	C
		321.0	17.53	3062	T	T	C
21	D4j	141.0	8.94	16039	G	G	A
22	B4a1c1a1	70.0	9.85	16150	C	C	T
23	D4a1	177.0	9.87	9742	C	C	T
24	M7a1a9	104.0	10.49	4728	A	A	G
25	N9a2a	176.0	11.04	3335	T	T	C
26	D4a2a	102.0	11.54	9064	G	G	A
27	D4j	87.0	11.66	11598	C	C	T
28	G1a1a	102.0	12.35	16129	G	A	G
29	A5a1a	142.0	12.80	2383	T	T	C
30	A5a1a	250.0	16.03	4050	C	T	C
31	M7b1a1a	309.0	17.66	64	C	C	T
32	G1a1a	312.9	17.68	16111	C	C	T
		257.0	18.24	16140	T	T	C

	87.0	18.75	12361	A	A	G
	66.0	19.88	16234	C	C	T
	65.0	21.67	16223	C	T	C
33 G1a1a1	186.0	18.36	15987	C	C	T
34 M7a1a	68.0	22.37	13810	G	A	G
35 M7b1a1a1	262.0	23.93	15686	A	A	G
36 D4b1a1	287.0	26.04	64	C	C	T
37 D4a1c	105.0	27.93	4088	C	C	T
38 B4a1c1a	272.0	29.28	8805	A	G	A
39 D4a3b	150.0	37.69	6325	C	C	T
40 A5a	96.0	45.93	13704	C	T	C

Total 40개체 52곳의 이형세포질성

rCRS: 개정캠프리지표준서열 (Revised Cambridge Reference Sequence)

[표 12] 점 이형세포질성 변이의 분포

하플로그룹	시료수		점 이형세포질성 변이의 수		
	전체 시료수	점이형 세포질성 시료수 (개체수)	조절 부위	암호 부위	전체 미토콘드리아 DNA
D4a, D4a3, D4b1, D5b	52	11 (21.15%)	4	9	13
A5a	20	4 (20.00%)	1	3	4
M7a1, M7b1	19	5 (26.32%)	1	4	5
F1b1	16	1 (6.25%)	0	3	3
G1a1	19	4 (21.05%)	5	4	9
B4a, B4c1c	20	6 (30.00%)	3	3	6
N9a2a	11	4 (36.36%)	1	5	6
M9;G;D	17	5 (29.41%)	1	5	6
Y1	12	0 (0.00%)	0	0	0
전체	186	40 (21.51%)	16 (30.77%)	36 (69.23%)	52 (100%)

[표 13] 염기서열해독에서 coverage비교

본연구, Seo 등의 연구, Zhou 등의 연구 모두 Ion Torrent PGM을 기반으로 하는 차세대염기서열분석기법을 적용하여 미토콘드리아 염기서열을 분석한 연구로, coverage와 미토콘드리아 DNA 염기서열에 따른 비교분석을 하였다. 낮은 coverage를 보이는 부분에서 공통적으로 NADH 탈수소효소 아단위 5와 아단위 6의 유전자가 위치하는 암호부위가 있음을 알 수 있다.

	본연구	Seo 등의 연구	Zhou 등의 연구
높은 coverage	2600~2900	2409~3201	500~900
낮은 coverage	13600~14800	13271~14859	13600~13800 14100~14900
평균 coverage	1,200X	810X	1,269X

[표 14] VCF에서 오검출된 변이: 본연구와 다른 연구와 비교분석

변이	본연구	Zhou 등	Parson 등	Seo 등
249del	247GA→ 247G	247GA→ 247G		
523- 524del	513GCA→ 513G	513GCA→ 513G		514- 524
573.1C	보고안됨	567A→ 567ACCC, 567ACCCC, 567ACCCCC	573.1C, 573.2C 573.3C	
4248C	4246TT→ AT/ATC	보고안됨		
960.1C	보고안됨	보고안됨		
2156.1A	2150T→ 2150TA	2150T→ 2150TA		
5899.1C	5894A→ 5894AC	보고안됨		
8281- 8289del	8270CACCCCCTC T→ 8270C	8270CACCCCCTCT→ 8270C 8270CACCCCCTCTA C→ 8270CAC	8286del	8280- 8288del
16182C	보고안됨	보고안됨	보고안됨	
16183C	보고안됨	보고안됨	보고안됨	

[표 15] 동형세포질성 변이의 민족간 비교

변이양상	본연구 (한국인)	Zhou 등 (중국한족)	Stoljarova 등 에스토니아인	King 등 (미국인)
연구대상	186명	107명	114명	283명
전체 변이 수	6,495	4,022	2,663	11,607
뉴클레오티드 위치 수	455곳	725곳	512곳	1,353곳
1개체당 평균 변이 수	34.9	37.6	23.4	41.0
조절부위 변이 수	1,682 (25.9%)	892 (22.18%)	607 (22.8%)	2,938 (25.3%)
암호부위 변이 수	4,813 (74.1%)	3,130 (77.82%)	2,056 (77.2%)	8,669개 (74.7%)
치환 변이	6,336 (97.55%)	3,919 (97.44%)		
삽입결실 변이	159 (2.45%)	103 (2.56%)		

[표 16] 한국인 및 다른 민족에서 공통적으로 나타나는 변이 비교

변이	본연구 (한국인)	Zhou 등 (중국한족)	Maruyama 등 (일본)	Stoljarova 등 에스토니아인	King 등 (미국인)
	73G	73G	73G		
	263G	263G	263G	263G	263G
	750G	750G		750G	
	1438G	1438G		1438G	
		2706G			
모두	4769G	4769G		4769G	4769G
	7028G	7028G			
		8860G		8860G	
	11719G	11719G			
	14766T	14766T			
	15326G	15326G		15326G	15326G
	489C	489C	16362C	73G	340
	2706G			2706G	679
	8701G	8701G		7028T	1357
	9540C	9540C		11719A	2713
	10398G	10398G		14766T	4747
	10400T	10400T			7120
절반 이상	10873C	10873C			8815
	12705T	12705T			11866
	14783C	14783C			14917
	15043A	15043A			15256
	15301A	15301A			16273
	16223T	16223T			16612
	16519C	16519C		16519C	

[표 17] 한국인과 중국 한족의 하플로그룹 세분화 양상 비교

본연구(한국인)		Zhou 등 (중국한족)	
조절부위	전체염기서열	조절부위	전체염기서열
A	A5a	A	A5b, A
		A14	A24
	A5a1a1, A5a1a2, A5a3	A15	A15, A15a
		A5a	A5a
B	B4a	B4	B4d1a, B4d1' 2' 3,
		B4b1	B4a3
		B4b1b' c	B4b1a
		B4c1b	B4b1c
		B4c1b2a	B4c1b2c
		B4h1	B4c1b2a
		B5b2a	B4h1
		B5b2a1b	B5b2a
D			B5b2a1b
		D	D4e1
		D4	D4j/D4
		D4a1e	D4a5
		D4b1a2a1	D4a1e
		D4b2b	D4a3b
		D4b2b5	D4b1a2a1
		D4c	D4b2b2
		D4c1b	D4b2b5
		D4c1	D4c2
		D4g2a	D4c1b
		D4j3	D4
		D4k	D4g2a1
		D4o2a	D4j3
		D5a2a	C4a1
		D5a2a1	D4o2a
		D5b	D5a2a, D5a2a1
		D5c2	D5a2a1b
		M9a1a1c1b1	
		M74	
D	D4a	D4a, D4a1, D4a1a, D4a1b, D4a1c, D4a2, D4a2a, D4f1	
	D4a3	D4a3b	
	D4b1	D4b1a1	
	M9;G;D	D4b2a2, D4d, D4e2, D4e2a, D4f1, D4j	

F	F1b1	F1b1a, F1b1a1, F1b1a1a, F1b1a1a1, F1b1a1a2, F1b1a2	F	F2, F2f
			F1	F1g1
			F1a1	F1a1
			F1a1a	F1a1a
			F1b	F1b1
			F1b1a	F1b1a
			F1b1b	F1b1b
			F1c1a1	F1c1a1
G	G1a1	G1a1, G1a1a1	F4a1a	F4a1a
			G1a1	G1a1
			G2a	G2a2
			G2a1d	G2a1d1a
M	M7a1 M7b1	M7a1a, M7a1a1, M7a1a5a, M7a1a9 M7b1a1a M7b1a1a1	G2a4	G2a4
			M10a1a1b	M10a1a1b
			M10a1a1b1	M10a1a1b1
			M45	M7c1a
			M7b1a1	M7b1a1e1, M7b1a1h
			M7b1a1a1	M7b1a1a1
			M7c1	M7c1c
			M8a	M8
			M8a2	M8a3
			M8a2' 3	M8a3, M8a2
			M8a2a	M8a3
			M8a2a1	M8a2a1
			M8a3a	M8a3a1
			M9a1a1c	M9a1a1c1a
			M9a1a1c1b	M9Ma1a
			M9a1a2	M9a1a2
			M33	G2b1a, G1c
			M9a' b	G
N	N9a2a	N9a2a, N9a2a2	N9a	N9a9
			N9a1	N9a1
			N9a1' 3	N9a3

[표 18] 하플로그룹 재분류 비교분석

하플로그룹	본연구 (한국인)	Zhou 등 (중국한족)	Stoljarova 등 (에스토니아인)	King 등 (미국인)
새로운 계통 하플로그룹 재분류	M9;G;D → 4b2a2	M9a' b → G	U5b2a1a2 → H	D4e1 → A2+64
	M9;G;D → D4d	M9a1a1c1b1 → D4		G3 → L2b1a4
	M9;G;D → D4e2	M33 → 2b1a		HV0 → V2
	M9;G;D → D4e2a	D4k → C4a1		M33c → A2+64
	M9;G;D → D4f1			N2 → L2e1f
	M9;G;D → D4j			N11a → L2a1a3
				P5 → H32
같은 계통 다른 하위 하플로그룹 재분류		C4b8 → C7		B4 → B2
				B4 → B2a
				B4 → B2c1
				B4 → B2f
				B4c1a2a → B2b
				H2a2a → H3
				H2a2a → H1bk
				H2a2a → H56a1
				H2a2a1d → H1c7
				H3v → H76
				K1c → K2b
				I2' 3 → I2

[표 19] 점이형세포질성(PHP)에 대한 비교

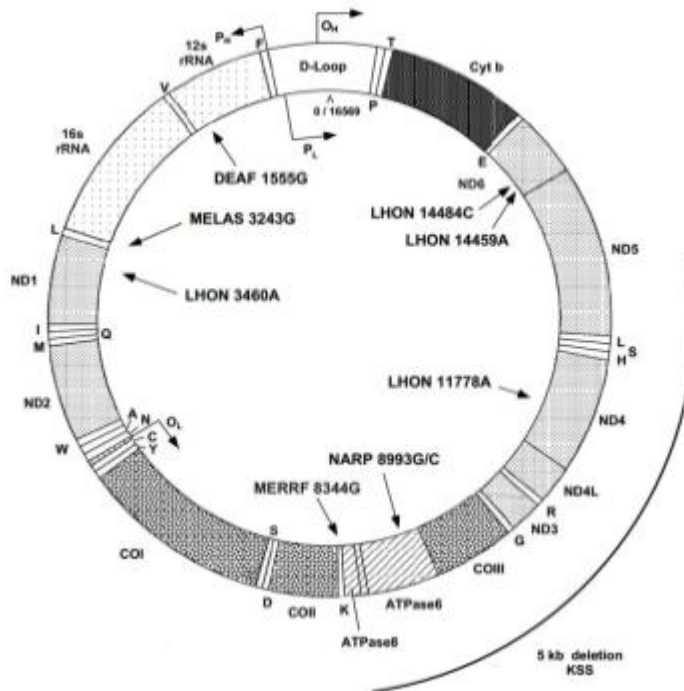
	본연구	Zhou 등 2016	Li 등 2014	King 등 2014	Li 등 2015	Skonieczna 등 2015	Sosa 등 2012
실험 방법	NGS/ PGM	NGS/ PGM	NGS/ Illumina GA II	NGS/ Illumina MiSeq	NGS/ Illumina HiSeq	NGS/ Roche 454	NGS/ Roche 454
기준	mtDNA- server >40X no numt	15%	10-20%	18% >7X	>0.5% allele frequency >50X	2%	10%
관찰 범위	0.61- 45.93%		8-46%			2-43%	9-50%
cover- age	>40X		67X±7		46- 36,444X	>65X	
개체수	186	107	131	283	139	50	40
PHP 개체	40 (21.51%)	22 (20.56%)	32 (24.24%)	68 (24.03%)	31 (22.30%)	16 (32.00%)	26 (65.00%)
PHP 전체	52	24	37	89	35	23	71
PHP 조절 부위	16 (30.77%)	6 (25.00%)	13 (35.14%)	31 (34.83%)	13 (37.14%)	13 (56.52%)	13 (18.31%)
PHP 암호 부위	36 (69.23%)	18 (75.00%)	24 (64.86%)	58 (65.17%)	22 (62.86%)	10 (43.48%)	58 (81.69%)
최대 PHP /개체	5	3	2	4	2	3	20

그림

[그림 1] 미토콘드리아 DNA의 구조 (www.mitomap.org)

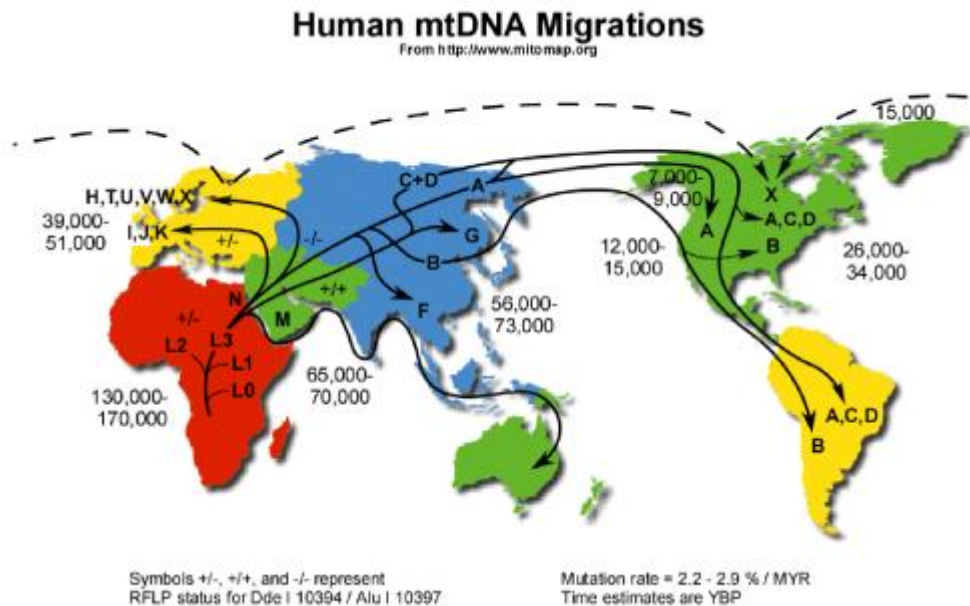
미토콘드리아 DNA는 무거운 가닥과 가벼운 가닥으로 구성된 2중 원형의 구조로 되어 있으며, D-Loop 부위 등 복제와 전사가 시작되는 부위가 있는 조절부위와 유전자가 암호화 되어 있는 암호부위로 구성되어 있다.

Morbidity Map of the Human mtDNA Genome



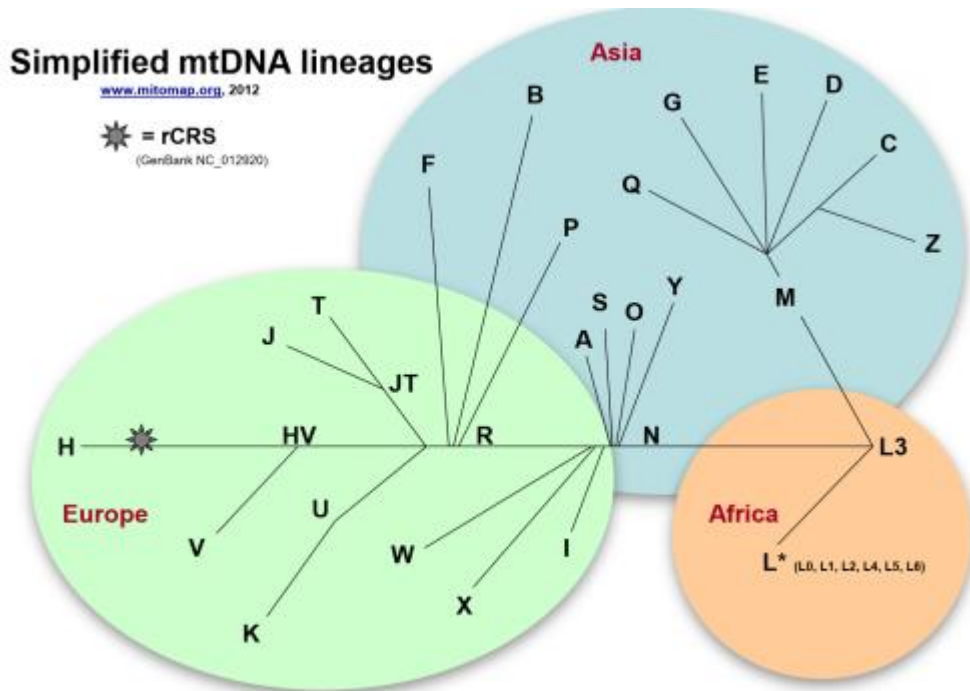
[그림 2] 미토콘드리아 DNA에 따른 인류의 이동과 분포
(www.mitomap.org)

인류는 아프리카에서 이주하기 시작하여 중동지역을 거쳐 일부는 유럽 중부와 북부로, 일부는 아시아 남쪽과 동남쪽으로 이동하였으며, 일부는 중국 지역에서 인도네시아 섬지역을 거쳐 뉴기니아, 호주로 이주하였고, 아시아 동쪽 끝을 따라 북쪽으로 베링해협을 건너 알래스카에서 남쪽으로 진행하여 북미, 중미, 남미로 이주하여 최종 뉴기니아와 오스트레일리아 북쪽 주변의 섬에서 북태평양(폴리네시아, 하와이 등)으로 이동하였을 것으로 본다.



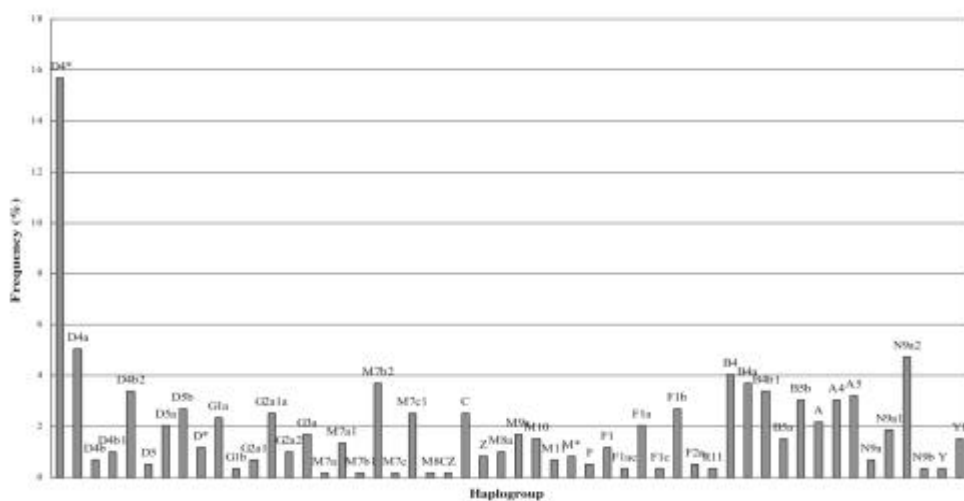
[그림 3] 인류 계통발생나무 (www.mitomap.org)

여러 연구를 통해 얻어진 미토콘드리아 DNA의 염기서열분석결과를 토대로 세계의 각 지역에 따라 분류되는 하플로그룹과 그 계통발생학적 나무가 수립되었다. 계통발생학적 뿌리는 아프리카에 두었으며 여기서부터 아시아와 유럽 등지로 분지되는 것으로 보았다. 아시아에서는 하플로그룹 M에서 각 세부군으로 분류되는 것을 알 수 있다.



[그림 4] 한국인에서 알려진 하플로그룹의 빈도 (Lee HY, et al., 2006)

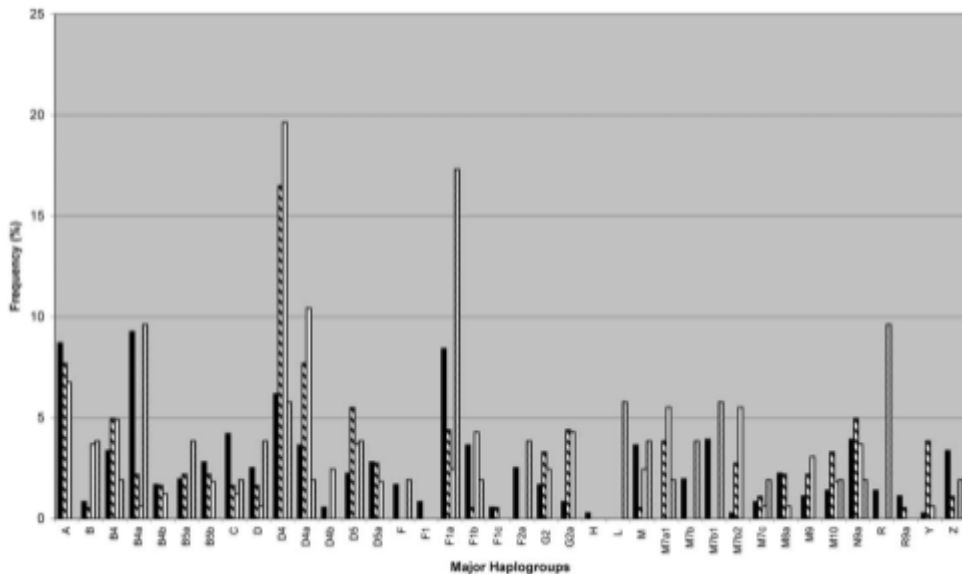
593명의 한국인을 대상으로 각 미토콘드리아 DNA 조절부위의 염기서열을 분석한 결과에 의거한 것으로 이를 통해 한국인에서 주로 나타나는 것으로 알려진 각 하플로그룹별 빈도를 보여주고 있다. 가장 흔한 하플로그룹으로 D4, D4a, N9a2 등이 있었다.



[그림 5] 동아시아인에서 주요 하플로그룹의 빈도 (Allard MW, et al., 2004)

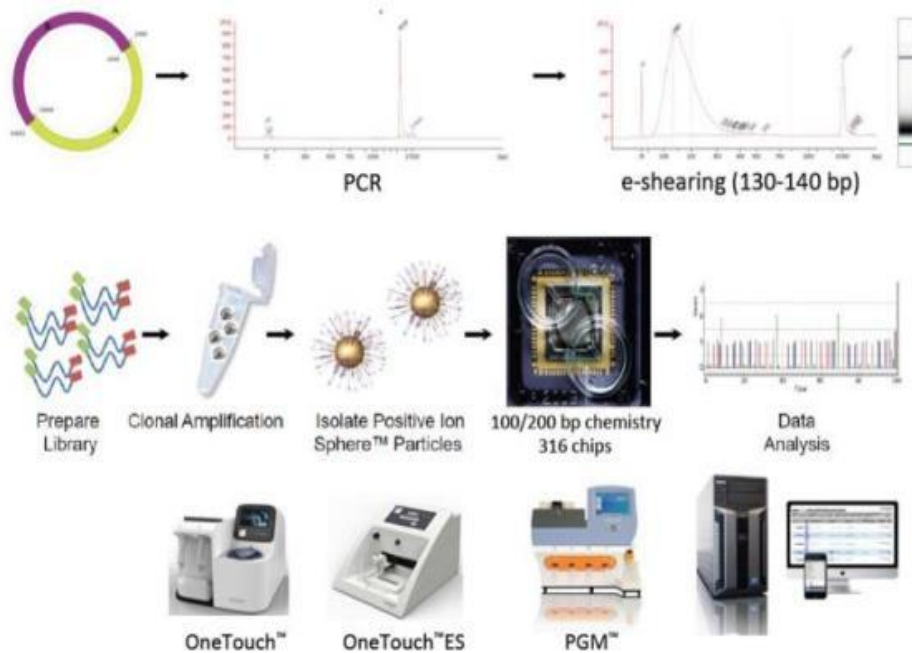
동아시아 인구(중국인 356명, 한국인 182명, 일본인 163명)를 대상으로 시행한 미토콘드리아 DNA 조절부위 염기서열분석 결과에 의거한 것으로 중국, 한국 일본 인구에서 주로 나타나는 하플로그룹의 빈도를 보여주고 있다. (검정색 막대: 중국, 사선 막대: 한국, 흰색 막대: 일본)

한국인에서 가장 많았던 하플로그룹은 D4였으며, 이외 하플로그룹 A, D4a, D5 등이 있었다.

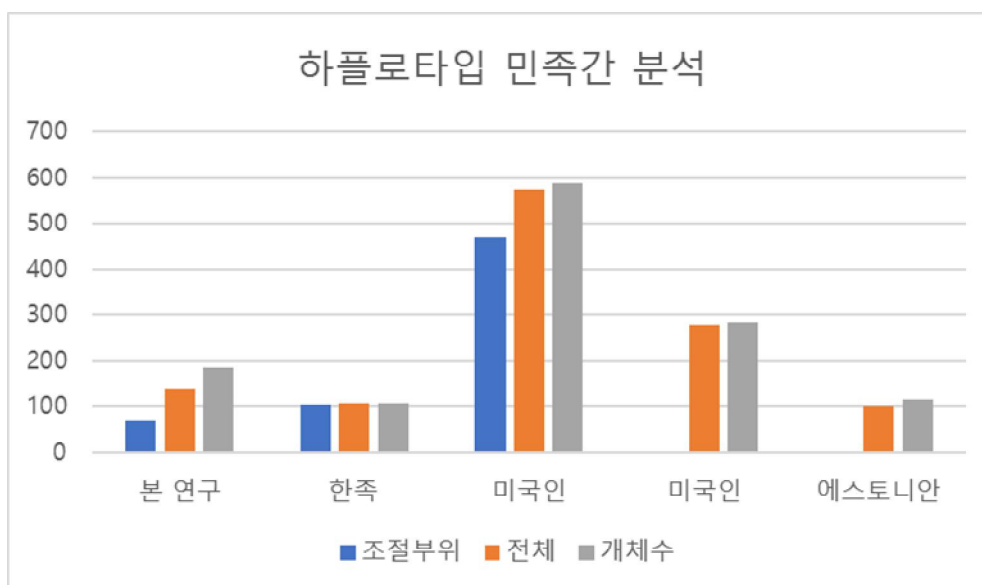
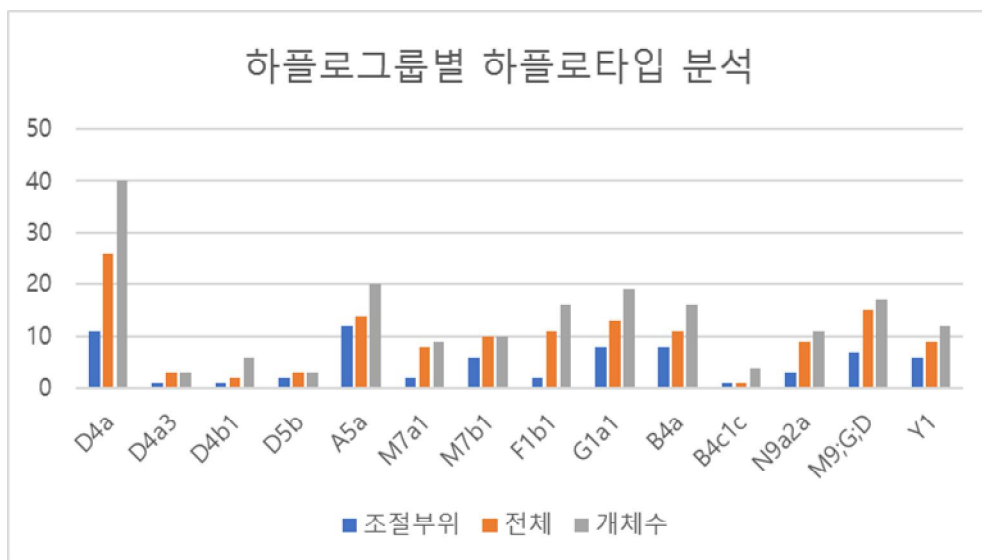


[그림 6] Ion Torrent PGM (Personal Genome Machine) 기법

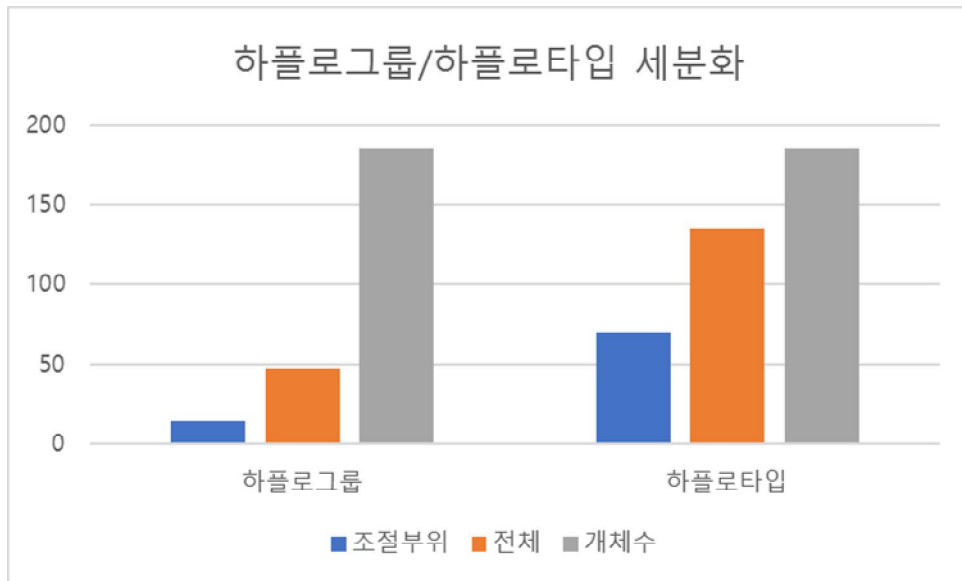
차세대염기서열분석기법으로 Ion Torrent Personal Genome Machine (PGM)을 이용하여 초병렬염기서열분석을 시행하였으며 그 방법은 다음과 같았다.



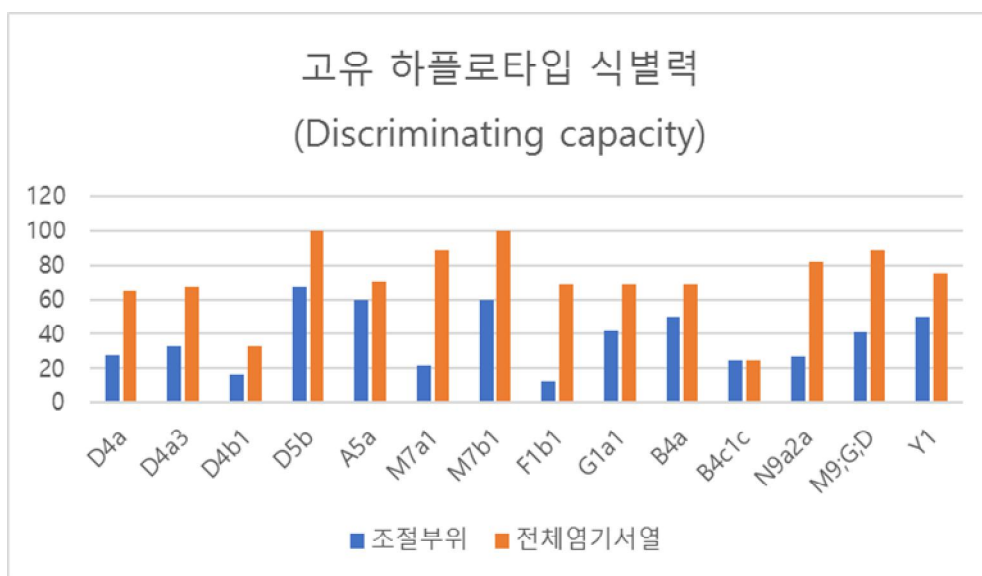
[그림 7] 한국인에서 하플로타입 양상 및 다른 민족간 비교분석



[그림 8] 전체염기서열분석결과 하플로그룹/하플로타입 세분화



[그림 9] 전체염기서열분석결과 하플로타입 식별력 증가



부록

밑줄: 조절부위 변이

글자테두리: 세분화된 하플로그룹을 결정하는 변이

개체	미토콘드리아 DNA 전체염기서열 변이	하플로그룹	
		조절부위	전체
1	<u>73, 152, 228, 263, 489, 750, 1438, 2706, 3010, 3206, 4769, 4883, 5178, 6551, 7028, 8414, 8473, 8701, 8860, 9540, 10398, 10400, 10873, 11719, 12705, 14668, 14766, 14783, 14979, 15043, 15301, 15326, 16129, 16223, 16362</u>	D4a	D4a
2	<u>73, 151, 152, 263, 489, 750, 1438, 2706, 3010, 3206, 4053, 4769, 4883, 5178, 7028, 8414, 8473, 8701, 8860, 9540, 10398, 10400, 10873, 11719, 12705, 13596, 13650, 13759, 14494, 14560, 14668, 14766, 14783, 14979, 15043, 15301, 15326, 16129, 16223, 16362, 16519</u>	D4a	D4a
3	<u>73, 151, 152, 263, 489, 750, 1438, 2706, 3010, 3206, 4053, 4769, 4883, 5178, 7028, 7854, 8414, 8473, 8701, 8860, 9540, 10398, 10400, 10873, 11719, 12498, 12705, 13650, 13759, 14494, 14560, 14668, 14766, 14783, 14979, 15043, 15301, 15326, 16129, 16223, 16362, 16519</u>	D4a	D4a
4	<u>73, 152, 263, 489, 750, 1438, 2706, 3010, 3206, 4769, 4883, 5178, 7028, 8414, 8473, 8701, 8860, 9540, 10398, 10400, 10873, 11719, 12705, 14668, 14766, 14783, 14926, 14979, 15043, 15301, 15326, 16129, 16223, 16362, 16519</u>	D4a	D4a1
5	<u>73, 152, 263, 455, 489, 750, 1438, 2706, 3010, 3206, 4769, 4883, 5178, 7028, 8473, 8701, 8860, 9540, 10398, 10400, 10873, 11185, 11719, 12705, 14539, 14668, 14766, 14783, 14979, 15043, 15301, 15326, 16129, 16223, 16355, 16362, 16519</u>	D4a	D4a1

6	<u>73, 152, 263, 489,</u> 750, 1438, 2706, 3010, 3206, 4769, 4883, 5178, 7028, 8414, 8473, 8701, 8860, 9540, 10398, 10400, 10410 , 10873, 11719, 12705, 14668, 14766, 14783, 14979, 15043, 15301, 15326, <u>16129, 16223,</u> <u>16362, 16519</u>	D4a	D4a1
7	<u>73, 152, 263, 489,</u> 750, 1438, 2706, 3010, 3206, 4769, 4883, 5178, 7028, 8414, 8473, 8701, 8860, 9540, 10398, 10400, 10410 , 10873, 11383, 11719, 12705, 14668, 14766, 14783, 14979, 15043, 15301, 15326, <u>16129,</u> <u>16172, 16223, 16362, 16519</u>	D4a	D4a1
8	<u>73, 152, 263, 455, 489,</u> 750, 1438, 2706, 3010, 3206, 4769, 4883, 5178, 7028, 8473, 8701, 8860, 9540, 10398, 10400, 10410 , 10873, 11185, 11719, 12705, 14539, 14668, 14766, 14783, 14979, 15043, 15301, 15326, <u>16103,</u> <u>16129, 16223, 16355, 16362, 16519</u>	D4a	D4a1
9	<u>73, 152, 263, 489,</u> 750, 1438, 2706, 3010, 3206, 4769, 4883, 5178, 5921, 7028, 8414, 8473, 8701, 8860, 9540, 10398, 10400, 10410 , 10873, 11719, 12705, 14668, 14766, 14783, 14979, 15043, 15301, 15326, <u>16129, 16223,</u> <u>16362, 16519</u>	D4a	D4a1
10	<u>73, 152, 263, 489,</u> 750, 1438, 2706, 3010, 3206, 4769, 4883, 5178, 7028, 8414, 8473, 8701, 8860, 9540, 10398, 10400, 10410 , 10873, 11719, 12705, 14668, 14766, 14783, 14926, 14979, 15043, 15301, 15326, <u>16129,</u> <u>16223, 16362, 16519</u>	D4a	D4a1
11	<u>73, 152, 263, 489,</u> 750, 1438, 2706, 3010, 3206, 4769, 4883, 5178, 7028, 8414, 8473, 8701, 8860, 9540, 10398, 10400, 10410 , 10873, 11719, 12705, 14668, 14766, 14783, 14979, 15043, 15301, 15326, <u>16129, 16223,</u> <u>16362, 16519</u>	D4a	D4a1

12	<u>73, 152, 263, 489</u> , 750, 1438, 2706, 3010, 3206, 4769, 4883, 5178, 7028, 8414, 8473, 8701, 8860, 9540, 10398, 10400, 10410 , 10873, 11719, 12705, 14668, 14766, 14783, 14979, 15043, 15301, 15326, <u>16129, 16223</u> , <u>16362, 16519</u>	D4a	D4a1
13	<u>73, 152, 263, 310, 489</u> , 750, 1438, 2706, 3010, 3206, 4769, 4883, 5178, 7028, 8414, 8473, 8701, 8860, 9540, 10398, 10400, 10410 , 10873, 11719, 12705, 14668, 14766, 14783, 14979, 15043, 15301, 15326, <u>16129, 16192</u> , <u>16223, 16362, 16519</u>	D4a	D4a1
14	<u>73, 152, 263, 489</u> , 750, 1438, 2706, 3010, 3206, 4769, 4883, 5178, 5261 , 7028, 8414, 8473, 8701, 8860, 9540, 10398, 10400, 10410 , 10873, 11719, 12705, 14668, 14766, 14783, 14979, 15043, 15301, 15314 , 15326, <u>16129</u> , <u>16223, 16362, 16519</u>	D4a	D4a1a1
15	<u>73, 152, 263, 489</u> , 750, 1438, 2706, 3010, 3206, 4769, 4883, 5178, 5261 , 7028, 8414, 8473, 8701, 8860, 9540, 10398, 10400, 10410 , 10873, 11719, 12705, 14668, 14766, 14783, 14979, 15043, 15301, 15314 , 15326, <u>16129</u> , <u>16223, 16362, 16519</u>	D4a	D4a1a1
16	<u>73, 152, 263, 489</u> , 750, 1438, 2706, 3010, 3206, 4769, 4883, 5178, 7028, 8414, 8473, 8701, 8860, 9007, 9540, 10398, 10400, 10410 , 10873, 11719, 12705, 13651 , 14668, 14766, 14783, 14979, 15043, 15301, 15326, <u>16129</u> , <u>16223, 16362, 16519</u>	D4a	D4a1b
17	<u>73, 152, 263, 489</u> , 750, 1438, 2706, 3010, 3206, 4769, 4883, 5178, 5306, 7028, 8414, 8473, 8701, 8860, 9540, 10398, 10400, 10410 , 10873, 11719, 12705, 13651 , 14668, 14766, 14783, 14979, 15043, 15301, 15326, <u>16129</u> , <u>16223, 16362, 16519</u>	D4a	D4a1b

18	<u>73, 152, 263, 489, 750, 1438, 2706, 3010,</u> 3206, 4769, 4883, 5178, 5628, 7028, 8414, 8473, 8701, 8860, 9540, 10398, 10400, <u>10410</u> , 10873, 11361, 11719, 12705, <u>13651</u> , 14668, 14766, 14783, 14979, 15043, 15301, 15326, <u>16129, 16223, 16362, 16519</u>	D4a	D4a1b
19	<u>73, 152, 263, 489, 750, 870, 1438, 2706, 3010,</u> 3083, 3206, 3510, 4638, 4769, 4883, 5178, 7028, 8414, 8473, 8701, 8860, 9540, 10398, 10400, <u>10410</u> , 10873, 11719, 12705, <u>13651</u> , 14668, 14766, 14783, 14979, 15043, 15301, 15326, <u>16129, 16223, 16362, 16519</u>	D4a	D4a1b
20	<u>73, 152, 263, 489, 750, 870, 1438, 2706, 3010,</u> 3083, 3206, 3510, 4638, 4769, 4883, 5178, 7028, 8414, 8473, 8701, 8860, 9540, 10398, 10400, <u>10410</u> , 10873, 11719, 12705, <u>13651</u> , 14668, 14766, 14783, 14979, 15043, 15301, 15326, <u>16129, 16223, 16362, 16519</u>	D4a	D4a1b
21	<u>73, 152, 263, 489, 750, 1438, 2706, 3010,</u> 3206, 4769, 4883, 5178, 7028, 8414, 8473, 8701, 8860, 9540, 10398, 10400, <u>10410</u> , 10873, 11719, 12705, <u>13651</u> , 14668, 14766, 14783, 14979, 15043, 15301, 15326, <u>16129,</u> <u>16223, 16362, 16519</u>	D4a	D4a1b
22	<u>73, 152, 263, 489, 750, 1438, 2706, 3010,</u> 3206, 4769, 4883, 5178, 7028, 8414, 8473, 8701, 8860, 9540, 10398, 10400, <u>10410</u> , 10873, 11719, 12705, <u>13651</u> , 14668, 14766, 14783, 14979, 15043, 15301, 15326, <u>16129,</u> <u>16223, 16362, 16519</u>	D4a	D4a1b
23	<u>73, 152, 263, 489, 750, 1438, 2706, 3010,</u> 3206, 4769, 4883, 5178, 7028, 8414, 8473, 8701, 8860, 9540, 10398, 10400, <u>10410</u> , 10873, 11719, 12705, <u>13651</u> , 14668, 14766, 14783, 14979, 15043, 15301, 15326, <u>16129,</u> <u>16223, 16362, 16519</u>	D4a	D4a1b

24	<u>73, 152, 263, 489</u> , 750, 1438, 2706, 3010, 3206, 4769, 4883, 5178, 5306, 7028, 8414, 8473, 8701, 8860, 9540, 10398, 10400, 10410 , 10873, 11719, 12705, 13651 , 14668, 14766, 14783, 14979, 15043, 15301, 15326, <u>16129</u> , <u>16203, 16223, 16362, 16519</u>	D4a	D4a1b
25	<u>73, 152, 263, 489</u> , 750, 1438, 2030, 2706, 3010, 3206, 4769, 4883, 5178, 7028, 8414, 8473, 8701, 8860, 9540, 10398, 10400, 10410 , 10873, 11719, 12705, 13651 , 14668, 14766, 14783, 14979, 15043, 15301, 15326, 15530, <u>16129, 16223, 16247, 16259, 16362, 16519</u>	D4a	D4a1b
26	<u>73, 152, 207, 263, 489</u> , 709, 750, 1438, 2706, 3010, 3206, 4769, 4883, 5178, 7028, 7337, 7822 , 8125, 8414, 8473, 8701, 8860, 9540, 10398, 10400, 10410 , 10873, 11719, 12705, 14668, 14766, 14783, 14979, 15043, 15301, <u>15326, 16129, 16223, 16362, 16519</u>	D4a	D4a1c
27	<u>73, 152, 207, 263, 489</u> , 750, 1438, 2706, 3010, 3206, 4088, 4769, 4883, 5178, 7028, 7822 , 8414, 8473, 8701, 8860, 9540, 10398, 10400, 10410 , 10873, 11719, 12705, 14668, 14766, 14783, 14979, 15043, 15301, 15326, <u>16129</u> , <u>16223, 16362, 16519</u>	D4aD4a	D4a1c
28	<u>73, 152, 207, 263, 489</u> , 750, 1438, 2706, 3010, 3206, 4769, 4883, 5178, 7028, 7822 , 8414, 8473, 8701, 8860, 9540, 10398, 10400, 10410 , 10873, 11719, 12705, 14668, 14766, 14783, 14979, 15043, 15301, 15326, <u>16129, 16223</u> , <u>16362, 16519</u>	D4a	D4a1c
29	<u>73, 152, 263, 489</u> , 750, 1438, 2706, 3010, 3206, 4769, 4883, 5178, 7028, 7822 , 8414, 8473, 8701, 8860, 9540, 9801, 10398, 10400, 10410 , 10873, 11719, 12705, 14668, 14766, 14783, 14979, 15043, 15301, 15326, <u>16129</u> , <u>16223, 16362, 16519</u>	D4a	D4a1c

30	<u>73, 152, 263, 489,</u> 750, 1438, 2706, 3010, 4769, 4883, 5178, 7028, 8414, 8473, 8701, 8860, 9540, 10398, 10400, 10873, 11719, 12705, 12957 , 14668, 14766, 14783, 14979, 15043, 15301, 15326, <u>16129, 16148, 16223,</u> <u>16362, 16519</u>	D4a	D4a2
31	<u>73, 152, 263, 489,</u> 750, 1438, 2706, 3010, 4769, 4883, 5178, 7028, 8414, 8473, 8701, 8860, 9540, 10398, 10400, 10873, 11719, 12705, 12957 , 14668, 14766, 14783, 14979, 15043, 15301, 15326, <u>16129, 16148, 16223,</u> <u>16362, 16519</u>	D4a	D4a2
32	<u>73, 152, 263, 489,</u> 750, 1438, 2706, 3010, 3206, 4769, 4883, 5178, 7028, 8414, 8473, 8701, 8860, 9540, 10398, 10400, 10873, 11719, 12705, 12957 , 14668, 14766, 14783, 14979, 15043, 15301, 15326, <u>16129, 16148,</u> <u>16223, 16362, 16519</u>	D4a	D4a2
33	<u>73, 152, 263, 489,</u> 750, 1438, 2706, 3010, 3206, 4769, 4883, 5178, 7028, 8414, 8473, 8701, 8860, 9540, 10398, 10400, 10873, 11719, 12705, 12957 , 14668, 14766, 14783, 14979, 15043, 15301, 15326, <u>16129, 16148,</u> <u>16223, 16362, 16519</u>	D4a	D4a2
34	<u>73, 152, 263, 489,</u> 750, 1438, 2706, 3010, 3206, 4769, 4883, 5178, 7028, 8414, 8473, 8701, 8860, 9540, 10398, 10400, 10873, 11719, 12705, 12957 , 14668, 14766, 14783, 14979, 15043, 15301, 15326, <u>16129, 16148,</u> <u>16223, 16362, 16519</u>	D4a	D4a2
35	<u>73, 152, 263, 489,</u> 750, 1438, 2706, 3010, 3206, 4769, 4883, 5178, 7028, 8414, 8473, 8701, 8860, 9540, 10398, 10400, 10873, 11719, 12705, 12957 , 14668, 14766, 14783, 14979, 15043, 15301, 15326, <u>16129, 16148,</u> <u>16223, 16362, 16519</u>	D4a	D4a2

36	<u>73, 152, 263, 489, 750, 1438, 2706, 3010,</u> 3206, 4769, 4883, 5178, 7028, 8020, 8414, 8473, 8701, 8860, 9540, 10398, 10400, 10873, 11719, 12705, 12957 , 14668, 14766, 14783, 14979, 15043, 15301, 15326, <u>16129, 16148,</u> <u>16223, 16362, 16519</u>	D4a	D4a2
37	<u>73, 152, 263, 489, 750, 1438, 2706, 3010,</u> 3206, 4769, 4883, 5178, 7028, 8414, 8473, 8701, 8860, 9540, 10398, 10400, 10873, 11719, 12705, 12957 , 14668, 14766, 14783, 14979, 15043, 15301, 15326, <u>16129, 16148,</u> <u>16223, 16362, 16519</u>	D4a	D4a2
38	<u>73, 152, 263, 489, 750, 1438, 2706, 3010,</u> 3206, 3531 , 4769, 4883, 5178, 7028, 8296 , 8414, 8473, 8701, 8860, 9540, 10005 , 10398, 10400, 10873, 11719, 12705, 12957 , 14668, 14766, 14783, 14979, 15043, 15301, 15326, <u>16129, 16223, 16362, 16519</u>	D4a	D4a2a
39	<u>73, 152, 194, 263, 489, 750, 1438, 3010, 4487*,</u> 4538 , 4769, 4883, 5178, 7028, 7270, 8414, 8701, 8764 , 8860, 9540, 10398, 10400, 10873, 11255 , 11719, 12705, 12957, 14668, 14766, 14783, 15043, 15301, 15326, <u>16129, 16223,</u> <u>16362, 16519</u>	D4a	D4f1
40	<u>73, 152, 263, 489, 750, 1438, 2706, 3010,</u> 3206, 4769, 4883, 5178, 7028, 8414, 8473, 8701, 8860, 9540, 10289, 10398, 10400, 10410 , 10873, 11719, 12705, 12957, 14668, 14766, 14783, 14979, 15043, 15301, 15326, <u>16129, 16223, 16291, 16362, 16519</u>	D4a	D4a1
41	<u>73, 152, 263, 489, 750, 1189, 1438, 2706,</u> 3010, 3206, 4769, 4883, 5178, 5466 , 6188, 6325, 7028, 7912 , 8414, 8473, 8701, 8860, 9254, 9540, 9554, 10398, 10400, 10873, 11719, 12705, 12957, 14668, 14766, 14783, 14979, 15040, 15043, 15301, 15326, 15884,	D4a3	D4a3b

	<u>16093, 16129, 16223, 16249, 16291, 16362</u>		
	<u>73, 152, 263, 489, 750, 1189, 1438, 2706, 3010, 3206, 4769, 4883, 5178, 5466, 6188, 6325, 6917, 7028, 7912, 8414, 8473, 8701,</u>		
42	8860, 9254, 9540, 9554, 10398, 10400, 10873, D4a3 11719, 12705, 12957, 14668, 14766, 14783, 14979, 15040, 15043, 15301, 15326, 16093 , <u>16129, 16223, 16249, 16291, 16362</u>	D4a3b	
	<u>73, 152, 263, 489, 750, 1189, 1438, 2706, 3010, 3206, 4769, 4883, 5178, 5466, 6188, 6325, 6917, 7028, 7912, 8414, 8473, 8701,</u>		
43	8860, 9254, 9540, 9554, 10398, 10400, 10873, D4a3 11719, 12705, 12957, 14180, 14668, 14766, 14783, 14979, 15040, 15043, 15301, 15326, <u>16093, 16129, 16223, 16249, 16291, 16362</u>	D4a3b	
	<u>73, 152, 263, 489, 523–524, 750, 1438, 2246, 2706, 3010, 4113, 4646, 4769, 4883, 5178, 6188, 6325, 7028, 8020, 8414, 8450, 8701,</u>		
44	8860, 9540, 10181, 10398, 10400, 10873, 11719, 12705, 12957, 13827 , 14091 , 14180, 14668, 14766, 14783, 14927 , 15043, 15301, 15326, 15440, 15805 , 15951, <u>16223, 16261,</u> <u>16291, 16319, 16362</u>	D4b1	D4b1a1
	<u>73, 152, 263, 489, 523–524, 750, 1438, 2246, 2706, 3010, 4113, 4646, 4769, 4883, 5178, 6188, 6325, 7028, 8020, 8414, 8450, 8701,</u>		
45	8860, 9540, 10181, 10398, 10400, 10873, 11719, 12705, 12957, 13827 , 14091 , 14180, 14668, 14766, 14783, 14927 , 15043, 15301, 15326, 15440, 15805 , 15951, <u>16223, 16291,</u> <u>16319, 16362</u>	D4b1	D4b1a1
	<u>73, 152, 263, 489, 523–524, 750, 1438, 2246, 2706, 3010, 4113, 4646, 4769, 4883, 5178,</u>		
46	6545, 7028, 8020, 8414, 8450 , 8701, 8860, 9540, 10181, 10398, 10400, 10873, 11719,	D4b1	D4b1a1

	12705, 12957, <u>13827</u> , <u>14091</u> , 14180, 14668, 14766, 14783, <u>14927</u> , 15043, 15301, 15326, 15440, <u>15805</u> , 15951, <u>16223</u> , <u>16291</u> , <u>16319</u> , <u>16362</u>		
47	<u>73</u> , <u>152</u> , 263, 489, <u>523–524</u> , 750, 1438, <u>2246</u> , 2706, 3010, 4113, 4646, 4769, 4883, 5178, 7028, 8020, 8414, <u>8450</u> , 8701, 8860, 9540, 10181, 10398, 10400, 10873, 11719, 12705, 12957, <u>13827</u> , <u>14091</u> , 14180, 14668, 14766, 14783, <u>14927</u> , 15043, 15301, 15326, 15440, <u>15805</u> , 15951, <u>16223</u> , <u>16291</u> , <u>16319</u> , <u>16362</u>	D4b1	D4b1a1
48	<u>73</u> , <u>152</u> , 263, 489, <u>523–524</u> , 750, 1438, <u>2246</u> , 2706, 3010, 4113, 4646, 4769, 4883, 5178, 7028, 8020, 8414, <u>8450</u> , 8701, 8860, 9527, 9540, 10181, 10398, 10400, 10873, 11719, 12705, 12957, <u>13827</u> , <u>14091</u> , 14180, 14668, 14766, 14783, 14927, 15043, 15301, 15326, 15440, <u>15805</u> , 15951, <u>16223</u> , <u>16291</u> , <u>16319</u> , <u>16362</u>	D4b1	D4b1a1
49	<u>73</u> , <u>152</u> , 263, 489, <u>523–524</u> , 750, 1438, <u>2246</u> , 2706, 3010, 4113, 4646, 4769, 4883, 5178, 7028, 8020, 8414, <u>8450</u> , 8701, 8860, 9540, 10181, 10398, 10400, 10873, 11719, 12705, 12957, <u>13827</u> , <u>14091</u> , 14180, 14668, 14766, 14783, 14927, 15043, 15301, 15326, 15440, <u>15805</u> , 15951, <u>16223</u> , <u>16291</u> , <u>16319</u> , <u>16362</u>	D4b1	D4b1a1
50	<u>73</u> , 150, 263, 456, 489, 681, 750, 1048, 1107, 1438, 2706, 3308, <u>3759</u> , 4769, 4883, 5147, 5153, 5178, 5301, <u>6253</u> , 7028, 7403, 8701, 8860, 9180, 9540, 10397, 10398, 10400, 10873, 11719, 12705, 12957, 14180, 14766, 14783, 15043, 15217, 15301, 15326, 15724, 15805, 15924, 15951, <u>16183</u> , <u>16189</u> , <u>16223</u> , <u>16291</u> , <u>16357</u> , <u>16362</u> , <u>16519</u>	D5b	D5b1b
51	<u>73</u> , 150, 263, 456, 489, 681, 750, 1048, 1107, 12705, 12957, 14180, 14766, 14783, 15043, 15217, 15301, 15326, 15724, 15805, 15924, 15951, <u>16183</u> , <u>16189</u> , <u>16223</u> , <u>16291</u> , <u>16357</u> , <u>16362</u> , <u>16519</u>	D5b	D5b1b

	1438, 2706, <u>3759</u> , 4769, 4883, 5153, 5178, 5301, <u>6253</u> , 7028, 8701, 8860, 9180, 9540, 10343, 10397, 10398, 10400, 10873, 11719, 12705, 12957, 14180, 14766, 14783, 15043, 15217, 15301, 15326, 15724, 15805, 15951, <u>16183, 16189, 16223, 16291, 16362, 16519</u>		
52	<u>64, 73, 150, 263, 456, 489, 681, 750, 1048, 1107, 1438, 2706, 3759, 4512, 4769, 4883, 5153, 5178, 5301, 6253, 7028, 7861, 8269, 8701, 8860, 9180, 9540, 10397, 10398, 10400, 10873, 11719, 12705, 12957, 14180, 14319, 14766, 14783, 15043, 15217, 15301, 15326, 15724, 15805, 15951, 16189, 16223, 16280, 16291, 16362, 16519</u>	D5b	D5b1b
53	<u>73, 195, 235, 263, 523-524, 663, 750, 1438, 1736, 2156, 2706, 4248, 4655, 4769, 4824, 7028, 8563, 8598, 8794, 8860, 11536, 11647, 11719, 12705, 14766, 15326, 16187, 16223, 16290, 16319</u>	A5a	A5a
54	<u>73, 235, 263, 523-524, 663, 750, 1438, 1736, 2156, 2706, 4248, 4655, 4769, 4824, 5250, 7028, 8563, 8794, 8860, 11536, 11647, 11719, 12705, 14766, 15326, 16187, 16223, 16290, 16319</u>	A5a	A5a
55	<u>73, 195, 235, 263, 523-524, 663, 750, 1438, 1736, 2156, 2706, 4248, 4655, 4769, 4824, 7028, 8563, 8598, 8794, 8860, 11536, 11647, 11719, 12705, 14766, 15326, 16187, 16223, 16290, 16319</u>	A5a	A5a
56	<u>73, 235, 263, 523-524, 663, 750, 1438, 1736, 2156, 2706, 4248, 4655, 4769, 4824, 7028, 8563, 8794, 8860, 11536, 11647, 11719, 12705, 13704, 14766, 15326, 16187, 16223, 16290, 16319</u>	A5a	A5a

	<u>73, 235, 263, 523–524</u> , 663, 750, 1438, 1736, 2156, 2706, 4248, 4655, 4769, 4824, 7028,		
57	8138, 8563, 8794, 8860, 11207, 11536, 11647, A5a 11719, 12705, 14766, 15326, <u>16129, 16187,</u> <u>16223, 16272, 16290, 16319</u>	A5a	A5a
	<u>73, 235, 263, 523–524</u> , 663, 750, 1438, 1736, 2156, 2706, 4248, 4655, 4769, 4824, 5250,		
58	7028, 8563, 8794, 8860, 11207, 11536, 11647, A5a 11719, 12705, 14766, 15326, <u>16187, 16223,</u> <u>16290, 16319</u>	A5a	A5a
	<u>73, 235, 263, 523–524</u> , 663, 750, 1438, 1736, 2156, 2706, 4248, 4655, 4769, 4824, 7028,		
59	8563, 8794, 8860, <u>10801</u> , 11207, 11536, A5a 11647, 11719, 12705, 14766, <u>14944</u> , 15326, <u>16187, 16223, 16290, 16296, 16319, 16465</u>	A5a	A5a1a
	<u>73, 235, 263, 523–524</u> , 663, 750, 1438, 1736, 2156, 2706, 4248, 4655, 4769, 4824, 7028,		
60	8563, 8794, 8860, <u>10801</u> , 11207, 11536, A5a 11647, 11719, 12705, 14766, <u>14944</u> , 15326, <u>16187, 16223, 16290, 16296, 16319, 16465</u>	A5a	A5a1a
	<u>73, 235, 263, 523–524</u> , 663, 750, 1438, 1736, 2156, 2706, 4248, 4655, 4769, 4824, 7028,		
61	8563, 8794, 8860, <u>10801</u> , 11207, 11536, A5a 11647, 11719, 12705, 14766, <u>14944</u> , 15326, <u>16187, 16223, 16290, 16296, 16319</u>	A5a	A5a1a
	<u>73, 235, 263, 523–524</u> , 663, 750, 1438, 1736, 2156, 2706, 4248, 4655, 4769, 4824, 7028,		
62	8563, 8794, 8860, <u>10801</u> , 11207, 11536, A5a 11647, 11719, 12705, 14766, <u>14944</u> , 15326, <u>16094, 16147, 16187, 16223, 16290, 16296,</u> <u>16319</u>	A5a	A5a1a
	<u>73, 235, 263, 523–524</u> , 663, 750, 1438, 1736, 2156, 2706, 4248, 4655, 4769, 4824, 7028,		
63	8563, 8794, 8860, <u>10801</u> , 11207, 11536, A5a 11647, 11719, 12705, 14766, <u>14944</u> , 15326, <u>16126, 16187, 16189, 16223, 16290, 16296,</u>	A5a	A5a1a

	<u>16319</u>		
64	73, 235, 263, <u>523–524</u> , 663, 750, 1438, 1736, 2156, 2706, 4248, 4655, 4769, 4824, 7028, 8563, 8794, 8860, <u>10801</u> , 11207, 11536, A5a 11647, 11719, 12705, 14766, <u>14944</u> , 15326, <u>16187, 16223, 16290, 16296, 16319, 16465</u>	A5a	A5a1a
65	73, 235, 263, <u>523–524</u> , 663, 750, 1438, 1736, 2156, 2706, 4050, 4248, 4655, 4769, 4824, 7028, 8563, 8794, 8860, <u>10801</u> , 11207, 11536, A5a 11647, 11719, 12705, 14766, <u>14944</u> , 15326, <u>16187, 16189, 16223, 16290, 16319</u>	A5a	A5a1a
66	73, 235, 263, <u>523–524</u> , 663, 750, 1438, 1736, 2156, 2706, 4248, 4655, 4769, 4824, 7028, 8563, 8619, 8794, 8860, <u>10801</u> , 11207, 11536, 11647, 11719, 12705, 14766, <u>14944</u> , 15326, <u>16094, 16187, 16223, 16290, 16296, 16319,</u> <u>16355</u>	A5a	A5a1a
67	73, 235, 263, <u>523–524</u> , 663, 750, 1438, 1736, 2156, 2706, 4248, 4655, 4769, 4824, 7028, 8563, 8794, 8860, 10295, <u>10801</u> , 11207, A5a 11536, 11647, 11719, 12705, 14766, <u>14944</u> , <u>15326, 16187, 16223, 16290, 16296, 16319</u>	A5a	A5a1a
68	73, 235, 263, <u>523–524</u> , 663, 750, 1438, 1736, 2156, 2706, 4248, 4655, 4769, 4824, 7028, 8563, 8619, 8794, 8860, <u>10801</u> , 11207, 11536, A5a 11647, 11719, 12705, 14766, <u>14944</u> , 15326, <u>16094, 16187, 16223, 16290, 16296, 16319</u>	A5a	A5a1a
69	73, 235, 263, <u>523–524</u> , 663, 750, 1438, 1736, 2156, 2706, 4248, 4655, 4769, 4824, 7028, 8563, 8794, 8860, <u>10801</u> , 11207, 11536, A5a 11647, 11719, 12705, 14766, <u>14944</u> , 15326, <u>16187, 16223, 16290, 16296, 16319</u>	A5a	A5a1a

70	<u>73, 235, 263, 523–524</u> , 663, 750, 1438, 1736, 2156, 2706, 3335, 4248, 4655, 4769, 4824, <u>5773</u> , 7028, 8020, 8563, 8794, 8860, <u>10801</u> , 11207, 11536, 11647, 11719, 12705, <u>12880</u> , 14766, <u>14944</u> , 15326, <u>16187, 16223, 16290,</u> <u>16319</u>	A5a	A5a1a1
71	<u>73, 235, 263, 523–524</u> , 663, 750, 1438, 1736, 2156, 2706, 4248, 4655, 4769, 4824, 7028, 8563, <u>8628</u> , 8794, 8860, <u>10801</u> , 11207, 11536, 11647, 11719, 12705, 14766, <u>14944</u> , 15326, <u>16187, 16189, 16223, 16290, 16319</u>	A5a	A5a1a2
72	<u>73, 207, 235, 263, 523–524</u> , 573, 663, 750, 1438, 1736, 2156, 2706, 4248, 4655, 4769, 4824, 7028, 8563, 8794, 8860, 11207, 11536, 11647, 11719, 12705, <u>12909</u> , 14766, 15272, <u>15326, 16093, 16187, 16223, 16290, 16319</u>	A5a	A5a3
73	<u>73, 263, 489, 523–524</u> , 750, 1438, 2626, 2706, 2772, 4386, 4769, 4958, 5899, 6455, 7028, 8308, 8701, 8860, 9540, 9824, 10398, 10400, 10873, <u>11017</u> , <u>11084</u> , 11719, 12705, 12771, 14364, 14766, 14783, 15043, 15301, 15326, <u>16209, 16223, 16324</u>	M7a1	M7a1a
74	<u>73, 263, 489, 523–524</u> , 750, 1438, 2626, 2706, 2772, 4386, 4769, 4958, 5899, 6455, 7028, 8308, 8701, 8860, 9540, 9824, 10398, 10400, 10873, <u>11017</u> , <u>11084</u> , 11719, 12705, 12771, 14364, 14766, 14783, 15043, 15301, 15326, <u>16209, 16223, 16324</u>	M7a1	M7a1a
75	<u>73, 263, 489, 523–524</u> , 750, 1438, 2626, 2706, 2772, 4386, 4769, 4958, 5899, 6455, 7028, 8308, 8701, 8860, 9540, 9824, 10398, 10400, 10873, <u>11017</u> , <u>11084</u> , 11719, 12705, 12771, 13810, 14364, 14766, 14783, 15043, 15236, <u>15301, 15326, 16209, 16223, 16324</u>	M7a1	M7a1a

76	<u>73, 263, 489, 523–524</u> , 750, 1438, 2626, 2706, 2772, 4386, 4769, 4958, 5899, 6455, 7028, 8701, 8860, 9540, 9824, 10398, 10400, 10589, 10873, <u>11017</u> , <u>11084</u> , 11719, <u>11722</u> , 12477, 12705, 12771, 14364, 14766, 14783, 15043, 15301, 15326, <u>16209</u> , <u>16223</u> , <u>16324</u>	M7a1	M7a1a1
77	<u>73, 263, 489, 523–524</u> , 750, 1438, 2626, 2706, 2772, 4248, 4386, 4769, 4958, 5899, 6455, 7028, 8271, 8701, 8860, 9540, 9824, 10400, 10873, <u>11017</u> , <u>11084</u> , 11167, 11719, 12705, 12771, 14180, 14364, 14766, 14783, 14927, 15043, 15301, 15326, 15884, <u>16209</u> , <u>16223</u> , <u>16324</u>	M7a1	M7a1a
78	<u>73, 263, 489, 523–524</u> , 750, 1438, 1664, 2626, 2706, 2772, 4218, 4386, 4769, 4958, 5899, 6455, 7028, <u>7852</u> , 8701, 8860, 9540, 9824, 10398, 10400, 10873, <u>11017</u> , <u>11084</u> , 11719, 12705, 12771, <u>13768</u> , 14364, 14766, 14783, 15043, 15301, 15326, <u>16209</u> , <u>16223</u> , <u>16324</u> , <u>16519</u>	M7a1	M7a1a5a
79	<u>73, 153, 263, 489, 523–524</u> , 750, 1438, 2626, 2706, 2772, <u>4048</u> , 4386, 4769, 4958, 5899, 6455, 7028, 8701, 8764, 8860, 9540, 9824, 10398, 10400, 10873, <u>11017</u> , <u>11084</u> , 11719, 12654, 12705, 12771, 14025, 14218, 14226, 14364, 14766, 14783, 15043, 15301, 15326, <u>16209</u> , <u>16223</u> , <u>16324</u>	M7a1	M7a1a9
80	<u>73, 153, 263, 489, 523–524</u> , 750, 1438, 2626, 2706, 2772, <u>4048</u> , 4386, 4769, 4958, 5899, 6455, 7028, 8701, 8764, 8860, 9540, 9824, 10398, 10400, 10873, <u>11017</u> , <u>11084</u> , 11719, 12654, 12705, 12771, 14025, 14218, 14364, 14766, 14783, 15043, 15301, 15326, <u>16209</u> , <u>16223</u> , <u>16311</u> , <u>16324</u>	M7a1	M7a1a9

81	<u>73, 263, 489, 523–524, 750, 1438, 2626, 2706,</u> 2772, 4048 , 4386, 4769, 4958, 5899, 6455, 7028, 8701, 8860, 9540, 9824, 10398, 10400, 10873, 11017 , 11084 , 11719, 12705, 12771, 14025, 14218, 14364, 14766, 14783, 15043, 15301, 15326, <u>16209, 16223, 16324</u>	M7a1	M7a1a9
82	<u>73, 150, 199, 263, 489, 750, 1438, 2706, 4048,</u> 4071, 4164, 4769, 5351, 5460, 6455, 6680, 7028, 7684, 7853, 8701, 8860, 9540, 9824, 10398, 10400, 10873, 11719, 12405, 12705, 12811, 14766, 14783, 15043, 15301, 15326, <u>16129, 16189, 16223, 16297, 16298, 16311</u>	M7b1	M7b1a1a
83	<u>73, 150, 199, 263, 489, 750, 1438, 2706, 4048,</u> 4071, 4164, 4622, 4769, 5351, 5460, 6455, 6680, 7028, 7684, 7853, 8701, 8860, 9540, 9824, 10345 , 10398, 10400, 10873, 11719, 12405, 12705, 12811, 14766, 14783, 15043, 15301, 15326, <u>16129, 16189, 16223, 16297,</u> <u>16298</u>	M7b1	M7b1a1a1
84	<u>73, 150, 199, 263, 489, 750, 1438, 2706, 4048,</u> 4071, 4164, 4769, 5351, 5460, 6455, 6680, 7028, 7684, 7853, 8701, 8860, 9540, 9824, 10345 , 10398, 10400, 10873, 11719, 12405, 12705, 12811, 14766, 14783, 15043, 15301, 15326, <u>16129, 16189, 16223, 16297, 16298</u>	M7b1	M7b1a1a1
85	<u>73, 150, 199, 263, 265, 489, 750, 1438, 2706,</u> 4048, 4071, 4164, 4769, 5351, 5460, 6455, 6680, 7028, 7684, 7853, 8701, 8860, 9540, 9824, 10345 , 10398, 10400, 10873, 11719, 12405, 12705, 12811, 14766, 14783, 15043, 15301, 15326, 15565, <u>16129, 16184, 16189,</u> <u>16223, 16297, 16298</u>	M7b1	M7b1a1a1

	<u>73, 150, 199, 263, 489, 750, 1438, 2706, 4048,</u> 4071, 4164, 4769, 5351, 5460, 6455, 6680, 7028, 7684, 7853, 8701, 8860, 9540, 9824,		
86	10345 , 10398, 10400, 10873, 11719, 12405, M7b1 12634, 12705, 12811, 13011, 14766, 14783, 15043, 15301, 15326, <u>16129, 16189, 16223,</u> <u>16297, 16298</u>	M7b1a1a1	
	<u>73, 150, 199, 263, 489, 750, 1438, 2706, 4048,</u> 4071, 4164, 4769, 5351, 5460, 6455, 6680, 7028, 7684, 7853, 8701, 8860, 9540, 9824,		
87	10345 , 10398, 10400, 10873, 11719, 12405, M7b1 12705, 12811, 13926, 14766, 14783, 15043, 15301, 15326, <u>16129, 16182, 16183, 16189,</u> <u>16223, 16297, 16298</u>	M7b1a1a1	
	<u>73, 146, 150, 199, 263, 489, 750, 1438, 2706,</u> 4048, 4071, 4164, 4769, 5351, 5460, 6455, 6680, 7028, 7684, 7853, 8701, 8860, 9540,		
88	9824, 10345 , 10398, 10400, 10873, 11719, M7b1 12405, 12705, 12811, 14766, 14783, 15043, 15301, 15326, <u>16129, 16183, 16189, 16192,</u> <u>16223, 16297, 16298</u>	M7b1a1a1	
	<u>73, 150, 199, 252, 263, 489, 750, 1438, 2706,</u> 4048, 4071, 4164, 4769, 5351, 5460, 6455, 6680, 7028, 7684, 7853, 8701, 8860, 9041,		
89	9540, 9824, 10345 , 10398, 10400, 10873, M7b1 11719, 12405, 12705, 12811, 14766, 14783, 15043, 15301, 15326, <u>16129, 16183, 16189,</u> <u>16223, 16297, 16298, 16311</u>	M7b1a1a1	
	<u>73, 150, 199, 263, 489, 750, 1438, 2706, 2887,</u> 4048, 4071, 4164, 4769, 5351, 5460, 6455, 6680, 7028, 7684, 7853, 8701, 8860, 9540,		
90	9824, 10345 , 10398, 10400, 10873, 11719, M7b1 12405, 12705, 12811, 14766, 14783, 15043, 15163, 15301, 15326, <u>16129, 16189, 16223,</u> <u>16297, 16298, 16311</u>	M7b1a1a1	

91	<u>73, 150, 199, 263, 489, 750, 1438, 2706, 4048,</u> 4071, 4164, 4769, 5351, 5460, 6455, 6680, 7028, 7684, 7853, 8701, 8823, 8860, 9540, 9824, 10345 , 10398, 10400, 10873, 11719, 12405, 12705, 12811, 14766, 14783, 15043, 15301, 15326, 15686, <u>16129, 16189, 16223,</u> <u>16297, 16298</u>	M7b1	M7b1a1a1
92	<u>73, 152, 249, 263, 523–524, 750, 1438, 2706,</u> 3970, 4732, 4769, 5147, 6392, 6962, 7028, 8860, 9038, 9092, 10310, 10609, 10976, 11719, 12406, 12633, 12882, 13928, 14476, 14766, 15326, <u>16129, 16182, 16183, 16189,</u> <u>16232, 16249, 16304, 16311, 16344, 16519</u>	F1b1	F1b1a
93	<u>73, 152, 249, 263, 523–524, 750, 1438, 2706,</u> 3970, 4732, 4769, 5147, 6392, 6962, 7028, 8860, 10310, 10609, 10976, 11719, 12406, 12633, 12882, 13928, 14476, 14766, 15326, 15954 , <u>16129, 16182, 16183, 16189, 16232,</u> <u>16249, 16304, 16311, 16344, 16519</u>	F1b1	F1b1a1
94	<u>73, 152, 249, 263, 523–524, 750, 1438, 2706,</u> 3970, 4732, 4769, 5147, 6392, 6962, 7028, 8860, 9377, 10310, 10609, 10976, 11719, 12406, 12633, 12882, 13743, 13928, 13932, 14249, 14476, 14766, 15326, 15326, 15954 <u>16129, 16182, 16183, 16189, 16232, 16249,</u> <u>16266, 16304, 16311, 16344, 16519</u>	F1b1	F1b1a1
95	<u>73, 152, 249, 263, 523–524, 750, 1438, 2706,</u> 3970, 4732, 4769, 5147, 6392, 6962, 7028, 8860, 9377, 10310, 10609, 10976, 11719, 12406, 12633, 12882, 13743, 13928, 13932, 14249, 14476, 14766, 15326, 15954 , <u>16129,</u> <u>16182, 16183, 16189, 16232, 16249, 16266,</u> <u>16304, 16311, 16344, 16519</u>	F1b1	F1b1a1

96	<u>73, 152, 249, 263, 523–524, 750, 1438, 2706,</u> 3970, 4732, 4769, 5147, 6218, 6392, 6962, 7028, 8860, 10310, 10609, 10976, 11719, 12406, 12633, 12882, 13928, 14476, 14766, 15326, <u>15954</u> , <u>16129, 16182, 16183, 16189,</u> <u>16232, 16249, 16304, 16311, 16344, 16519</u>	F1b1	F1b1a1
97	<u>73, 152, 249, 263, 523–524, 750, 1438, 2706,</u> 3970, 4732, 4769, <u>5049</u> , 5147, 6392, 6962, 7028, 8860, 10310, 10609, 10976, 11719, 12406, 12633, 12882, 13928, 14476, 14766, 15326, <u>15954</u> , <u>16129, 16182, 16183, 16189,</u> <u>16232, 16249, 16304, 16311, 16344, 16519</u>	F1b1	F1b1a1a
98	<u>73, 152, 249, 263, 523–524, 750, 1438, 2706,</u> 3970, 4732, 4769, <u>5049</u> , 5147, 6392, 6962, 7028, 8860, 10310, 10609, 10976, 11719, 12406, 12633, 12882, 13928, 14476, 14766, 15326, <u>15954</u> , <u>16129, 16182, 16183, 16189,</u> <u>16232, 16249, 16304, 16311, 16344, 16519</u>	F1b1	F1b1a1a
99	<u>73, 152, 249, 263, 523–524, 750, 1438, 2706,</u> 3970, 4732, 4769, <u>5049</u> , 5147, 6392, 6962, 7028, 8860, 10310, 10364, 10609, 10976, 11719, 12406, 12425, 12633, 12882, 13928, 14476, 14766, 15326, <u>15954</u> , <u>16129, 16182,</u> <u>16183, 16189, 16232, 16249, 16304, 16311,</u> <u>16344, 16519</u>	F1b1	F1b1a1a
100	<u>73, 152, 249, 263, 523–524, 750, 1438, 2706,</u> 3970, 4732, 4769, <u>5049</u> , 5147, 6392, 6962, 7028, 8860, 10310, 10609, 10976, 11719, 12406, 12633, 12882, 13928, 14476, 14766, 15326, <u>15954</u> , <u>16129, 16182, 16183, 16189,</u> <u>16232, 16249, 16304, 16311, 16344, 16519</u>	F1b1	F1b1a1a
101	<u>73, 152, 249, 263, 523–524, 750, 1438, 2706,</u> 3970, <u>4705</u> , 4732, 4769, <u>5049</u> , 5147, 6392, 6962, 7028, 7897, 8860, 10310, 10609, 10976, 11719, 12406, 12633, 12882, 13928, 14476, 14766, 15326, <u>15954</u> , <u>16129, 16182, 16183,</u>	F1b1	F1b1a1a1

	<u>16189, 16232, 16249, 16304, 16311, 16344, 16519</u>		
102	<u>73, 152, 249, 263, 509, 523–524, 750, 1438, 2706, 3970, 4732, 4769, 5049, 5147, 6392, 6962, 7028, 8860, 9148, 9389, 10310, 10609, 10940, 10976, 11719, 12406, 12633, 12882, 13928, 14476, 14766, 15326, 15954, 16129, 16182, 16183, 16189, 16232, 16249, 16304, 16311, 16344, 16519</u>	F1b1	F1b1a1a2
103	<u>73, 152, 249, 263, 523–524, 709, 750, 1438, 2706, 3970, 4732, 4769, 5049, 5147, 6392, 6962, 7028, 8860, 9389, 10310, 10609, 10976, 11404, 11719, 12406, 12633, 12882, 13928, 14476, 14766, 15326, 15954, 16129, 16182, 16183, 16189, 16232, 16249, 16304, 16311, 16344, 16519</u>	F1b1	F1b1a1a2
104	<u>73, 152, 249, 263, 385, 523–524, 750, 1438, 2706, 3970, 4732, 4769, 5147, 6392, 6962, 7028, 8860, 10609, 10976, 11719, 12406, 12633, 12882, 13928, 14476, 14629, 14766, 15326, 16129, 16182, 16183, 16189, 16232, 16249, 16304, 16311, 16344, 16519</u>	F1b1	F1b1a2
105	<u>73, 152, 249, 263, 523–524, 750, 1438, 2706, 3970, 4732, 4769, 5147, 5563, 6392, 6962, 7028, 8860, 10310, 10609, 10976, 11719, 12406, 12633, 12882, 13928, 14476, 14629, 14766, 15326, 16129, 16182, 16183, 16189, 16232, 16249, 16304, 16311, 16344, 16519</u>	F1b1	F1b1a2
106	<u>73, 152, 249, 263, 523–524, 750, 1438, 2706, 3395, 3970, 4732, 4769, 5147, 6392, 6962, 7028, 8860, 10310, 10609, 10976, 11719, 12406, 12633, 12882, 13928, 14476, 14629, 14766, 15326, 16129, 16182, 16183, 16189, 16232, 16249, 16304, 16311, 16344, 16519</u>	F1b1	F1b1a2

107	<u>73, 152, 249, 263, 523–524, 750, 1438, 2706, 3395, 3970, 4732, 4769, 5147, 6392, 6962, 7028, 7843, 8860, 10310, 10609, 10976, 11719, 12406, 12633, 12882, 13928, 14476, 14629, 14766, 15326, 16129, 16182, 16183, 16189, 16232, 16249, 16304, 16311, 16344, 16519</u>	F1b1	F1b1a2
108	<u>73, 150, 263, 489, 709, 750, 1438, 2706, 4769, 4793, 4833, 5108, 6533, 7028, 7867, 8200, 8701, 8860, 9540, 9959, 10398, 10400, 10873, 11719, 11914, 12372, 12705, 14569, 14766, 14769, 14783, 15043, 15301, 15323, 15326, 15497, 15860, 16223, 16325, 16362, 16519</u>	G1a1	G1a1a
109	<u>73, 150, 263, 489, 709, 750, 1438, 2706, 3531, 4769, 4793, 4833, 5108, 6842, 7028, 7867, 7948, 8200, 8701, 8860, 9410, 9540, 10398, 10400, 10873, 11719, 11914, 12705, 14569, 14766, 14783, 15043, 15301, 15323, 15326, 15448, 15497, 15860, 16209, 16223, 16325, 16362, 16519</u>	G1a1	G1a1a
110	<u>73, 150, 263, 489, 709, 750, 1438, 2706, 4769, 4793, 4833, 5108, 6533, 7028, 7867, 8200, 8701, 8860, 9540, 10398, 10400, 10873, 11719, 11914, 12705, 14569, 14766, 14783, 15043, 15301, 15323, 15326, 15497, 15860, 16129, 16223, 16325, 16362, 16519</u>	G1a1	G1a1a
111	<u>71, 73, 150, 263, 489, 709, 750, 1438, 2706, 4769, 4793, 4833, 5108, 7028, 7867, 8200, 8701, 8860, 9410, 9540, 10398, 10400, 10873, 11719, 11914, 12705, 14569, 14766, 14783, 15043, 15301, 15323, 15326, 15448, 15497, 15860, 16209, 16223, 16325, 16362, 16519</u>	G1a1	G1a1a

112	<u>73, 150, 263, 489, 709, 750, 1438, 2706, 4769,</u> <u>4793</u> , 4833, 5108, 7028, 7867, 8200, 8701, 8860, 9254, 9540, 10398, 10400, 10873, 11719, <u>11914</u> , 12705, 14569, 14766, 14783, 15043, 15301, 15323, 15326, 15497, 15860, <u>16223, 16325, 16362, 16519</u>	Gla1	Gla1a
113	<u>73, 150, 263, 489, 709, 750, 1438, 2706, 4769,</u> <u>4793</u> , 4833, 5108, 7028, 7867, 8200, 8701, 8860, 9254, 9540, 10398, 10400, 10873, 11719, <u>11914</u> , 12705, 14569, 14766, 14783, 15043, 15301, 15323, 15326, 15497, 15860, <u>16223, 16325, 16362, 16519</u>	Gla1	Gla1a
114	<u>73, 150, 183, 204, 263, 489, 709, 750, 1438,</u> 2706, 4769, <u>4793</u> , 4833, 5108, 7028, 7867, 8200, 8701, 8860, 9540, 10398, 10400, 10873, 11719, <u>11914</u> , 12705, 14569, 14766, 14783, 15043, 15301, 15323, 15326, 15497, 15860, <u>16223, 16325, 16362, 16519</u>	Gla1	Gla1a
115	<u>73, 150, 195, 263, 489, 709, 750, 1438, 2706,</u> 4769, <u>4793</u> , 4833, 5108, 7028, 7867, 8200, 8701, 8860, 9344, 9494, 9540, 10398, 10400, 10873, 11719, <u>11914</u> , 12705, 14569, 14766, 14783, 15043, 15301, 15323, 15326, 15497, 15860, <u>16223, 16325, 16362, 16519</u>	Gla1	Gla1a
116	<u>73, 150, 263, 489, 709, 750, 1438, 2706, 4769,</u> <u>4793</u> , 4833, 5108, 7028, 7867, 8200, 8701, 8860, 9540, 10398, 10400, 10873, 11719, <u>11914</u> , 12705, 14569, 14766, 14783, 15043, 15301, 15323, 15326, 15497, 15860, <u>16223,</u> <u>16325, 16362, 16519</u>	Gla1	Gla1a
117	<u>73, 150, 195, 263, 489, 709, 750, 1438, 2706,</u> 4769, <u>4793</u> , 4833, 5108, 7028, 7867, 8200, 8701, 8860, 9494, 9540, 10398, 10400, 10873, 11719, <u>11914</u> , 12705, 14569, 14766, 14783, 15043, 15217, 15301, 15323, 15326, 15497, 15860, <u>16223, 16325, 16362, 16519</u>	Gla1	Gla1a

118	<u>73, 150, 263, 489,</u> 709, 750, <u>827</u> , 1438, 1822,	Gla1	G1a1a1
	2706, 4769, <u>4793</u> , 4833, 5108, 7028, 7867,		
	8200, 8701, 8860, 9540, 9845, 10398, 10400,		
	10873, 11719, <u>11914</u> , 12705, 14569, 14766,		
	14783, 15043, 15301, 15323, 15326, 15497,		
	<u>15860, 16075, 16223, 16325, 16362, 16519</u>		
119	<u>73, 150, 263, 489,</u> 709, 750, <u>827</u> , 1438, 1822,	Gla1	G1a1a1
	2706, 4769, <u>4793</u> , 4833, 5108, 7028, 7867,		
	8200, 8701, 8860, 9540, 9845, 10398, 10400,		
	10873, 11719, <u>11914</u> , 12425, 12705, 14569,		
	14766, 14783, 15043, 15301, 15323, 15326,		
	15497, 15860, <u>16075, 16223, 16325, 16362,</u>		
	<u>16519</u>		
120	<u>73, 150, 263, 489,</u> 709, 750, <u>827</u> , 1438, 1822,	Gla1	G1a1a1
	2706, 4769, <u>4793</u> , 4833, 5108, 7028, 7867,		
	8200, 8701, 8856, 8860, 9540, 10398, 10400,		
	10873, 11719, <u>11914</u> , 12705, 14569, 14766,		
	14783, 15043, 15301, 15323, 15326, 15497,		
	<u>15860, 16075, 16223, 16325, 16362, 16519</u>		
121	<u>73, 150, 263, 489,</u> 709, 750, <u>827</u> , 1438, 1822,	Gla1	G1a1a1
	2706, 4769, <u>4793</u> , 4833, 5108, 7028, 7867,		
	8200, 8701, 8860, 9540, 9845, 10398, 10400,		
	10873, 11719, <u>11914</u> , 12705, 14569, 14766,		
	14783, 15043, 15301, 15323, 15326, 15497,		
	<u>15860, 16075, 16223, 16325, 16362, 16519</u>		
122	<u>73, 150, 263, 489,</u> 709, 750, <u>827</u> , 1438, 1822,	Gla1	G1a1a1
	2706, 4769, <u>4793</u> , 4833, 5108, 7028, 7867,		
	8200, 8701, 8860, 9540, 9845, 9948, 10398,		
	10400, 10873, 11719, <u>11914</u> , 12705, 14569,		
	14766, 14783, 15043, 15301, 15323, 15326,		
	15497, 15860, <u>16075, 16223, 16325, 16362,</u>		
	<u>16519</u>		

123	<hr/>		G1a1	G1a1a1
	73, 150, 263, 489, 709, 750, <u>827</u> , 1438, 1822, 2706, 4769, <u>4793</u> , 4833, 5108, 7028, 7867, 8200, 8701, 8860, 9540, 9845, 10398, 10400, 10873, 11719, <u>11914</u> , 12705, 14569, 14766, 14783, 15043, 15301, 15323, 15326, 15497, 15860, <u>16075, 16223, 16325, 16362, 16519</u>			
124	<hr/>		G1a1	G1a1a1
	73, 150, 263, 489, <u>523–524</u> , 709, 750, <u>827</u> , 1438, 2706, 4769, <u>4793</u> , 4833, 5108, 7028, 7867, 8200, 8701, 8860, 9540, 10398, 10400, 10873, 11719, <u>11914</u> , 12705, 14569, 14766, 14783, 15043, 15301, 15323, 15326, 15497, 15860, <u>16223, 16293, 16325, 16362, 16468, 16519</u>			
125	<hr/>		G1a1	G1a1a
	73, 150, 195, 263, 489, 709, 750, 1438, 2706, 4769, <u>4793</u> , 4833, 5108, 5147, 7028, 7867, 8200, 8701, 8860, 9494, 9540, 10398, 10400, 10873, 11719, <u>11914</u> , 12705, 14569, 14766, 14783, 15043, 15301, 15323, 15326, 15497, 15860, <u>16189, 16223, 16325, 16362, 16519</u>			
126	<hr/>		G1a1	G1a1a1
	73, 150, 263, 489, 709, 750, <u>827</u> , 1438, 1822, 2706, 4769, <u>4793</u> , 4833, 5108, 7028, 7867, 8200, 8701, 8860, 9540, 9845, 10398, 10400, 10873, 11719, <u>11914</u> , 12705, 14569, 14766, 14783, 15043, 15301, 15323, 15326, 15497, 15860, <u>16075, 16184, 16223, 16325, 16362, 16519</u>			
127	<hr/>		B4a	B4a1c1a1
	<u>73</u> , 75, <u>89</u> , 263, <u>523–524</u> , <u>709</u> , 750, 1438, 2706, 4232, 4769, 5465, 6185, 7028, 8281–8289, 8860, 9123, <u>9254</u> , <u>10238</u> , 11719, 14766, <u>15292</u> , 15326, <u>16182, 16183, 16189, 16217, 16261, 16519</u>			
128	<hr/>		B4a	B4a1c1a1
	71, <u>73</u> , <u>89</u> , 263, 279, <u>523–524</u> , <u>709</u> , 750, 1438, 2706, 4769, <u>5465</u> , 7028, 8281–8289, 8860, <u>9123</u> , <u>9254</u> , <u>10238</u> , 11719, 14766, <u>15292</u> , 15326, <u>16150, 16182, 16183, 16189, 16217</u>			

	<u>16261</u> , 16519		
129	<u>73</u> , <u>89</u> , 263, <u>279</u> , <u>523-524</u> , 709, 750, 1438, 2706, 3150, 4769, <u>5465</u> , 7028, 8281-8289, 8860, <u>9123</u> , 9254, 10238, 11719, 14766, 15292, 15326, <u>16182</u> , <u>16183</u> , <u>16189</u> , <u>16217</u> , <u>16261</u> , 16519	B4a	B4alclal
130	<u>73</u> , 263, <u>523-524</u> , 750, 1438, 2706, 3150, 4769, 6863, 7028, 8281-8289, 8860, 10398, 11719, 14410, 14766, 15326, 15381, <u>16150</u> , <u>16182</u> , <u>16183</u> , <u>16189</u> , <u>16217</u> , <u>16240</u> , <u>16261</u> , 16287	B4a	B4+16261
131	<u>73</u> , 263, <u>523-524</u> , 750, 1438, 2706, 3150, 4769, 6863, 7028, 8281-8289, 8860, 10398, 11719, 14410, 14766, 15326, 15381, <u>16150</u> , <u>16182</u> , <u>16183</u> , <u>16189</u> , <u>16217</u> , <u>16240</u> , <u>16261</u> , 16287	B4a	B4+16261
132	<u>73</u> , 263, <u>523-524</u> , 750, 1438, 2706, 3150, 4769, <u>5465</u> , 7028, 8281-8289, 8860, <u>9123</u> , 11719, 14766, 15326, 15926, <u>16154</u> , <u>16182</u> , <u>16183</u> , <u>16189</u> , <u>16217</u> , <u>16261</u> , 16519	B4a	B4a
133	<u>73</u> , 263, <u>523-524</u> , 750, 1438, 2706, 3150, 4769, <u>5465</u> , 7028, 8281-8289, 8860, <u>9123</u> , 11719, 14766, 15326, 15926, <u>16154</u> , <u>16182</u> , <u>16183</u> , <u>16189</u> , <u>16217</u> , <u>16261</u> , 16519	B4a	B4a
134	<u>73</u> , 263, <u>523-524</u> , 750, 1438, 2706, 3150, 4769, <u>5465</u> , 7028, 8281-8289, 8860, <u>9123</u> , 11719, 13293, 14766, 15326, 15926, <u>16154</u> , <u>16182</u> , <u>16183</u> , <u>16189</u> , <u>16217</u> , <u>16261</u> , 16519	B4a	B4a
135	<u>73</u> , 263, <u>523-524</u> , 750, 1438, 2706, 3150, 4769, <u>5465</u> , 7028, 8281-8289, 8860, <u>9123</u> , 11719, 14766, 15326, 15926, <u>16154</u> , <u>16182</u> , <u>16183</u> , <u>16189</u> , <u>16217</u> , <u>16261</u> , 16325, 16519	B4a	B4a

136	<hr/>		73, 263, 523–524, <u>709</u> , 750, 1438, 2706, 3150, 4769, <u>5465</u> , 7028, 8281–8289, 8595, 8860,		
	<u>9123</u> , <u>9254</u> , <u>10238</u> , 11719, 14766, <u>15292</u> , B4a	B4a1cla	15326, <u>16182</u> , <u>16183</u> , <u>16189</u> , <u>16217</u> , <u>16261</u> , <u>16519</u>		
137	<hr/>		73, 263, 523–524, <u>709</u> , 750, 1438, 2706, 3150, 4769, <u>5465</u> , 7028, 8281–8289, 8595, 8805,		
	8860, <u>9123</u> , <u>9254</u> , <u>10238</u> , 11719, 14766, B4a	B4a1cla	<u>15292</u> , 15326, <u>16182</u> , <u>16183</u> , <u>16189</u> , <u>16217</u> , <u>16261</u> , <u>16519</u>		
138	<hr/>		71, 73, 89, 94, 263, 523–524, <u>709</u> , 750, 1438, 2706, 3150, 4769, <u>5465</u> , 7028, 7533, 8281–		
	8289, 8860, <u>9123</u> , <u>9254</u> , <u>10238</u> , 10400, 11719, B4a	B4a1cla	14766, <u>15292</u> , 15326, <u>16182</u> , <u>16183</u> , <u>16189</u> , <u>16217</u> , <u>16218</u> , <u>16239</u> , <u>16261</u> , <u>16311</u> , <u>16519</u>		
139	<hr/>		71, 73, 75, 89, 94, 263, 523–524, <u>709</u> , 750, 1438, 2706, 3150, 4769, <u>5465</u> , 7028, 7533,		
	8281–8289, 8860, <u>9123</u> , <u>9254</u> , <u>10238</u> , 10400, B4a	B4a1cla	11719, 13182, 14766, <u>15292</u> , 15326, <u>16182</u> , <u>16183</u> , <u>16189</u> , <u>16217</u> , <u>16218</u> , <u>16239</u> , <u>16261</u> , <u>16311</u> , <u>16519</u>		
140	<hr/>		<u>73</u> , 75, <u>89</u> , 263, 523–524, <u>709</u> , 750, 1438, 2706, 3150, 4769, 5322, <u>5465</u> , 7028, 8281–		
	8289, 8860, <u>9123</u> , <u>9254</u> , <u>10238</u> , 11719, 14766, B4a	B4a1cla1	<u>15292</u> , 15326, <u>16182</u> , <u>16183</u> , <u>16189</u> , <u>16217</u> , <u>16261</u> , <u>16519</u>		
141	<hr/>		<u>73</u> , 75, <u>89</u> , 263, 523–524, <u>709</u> , 750, 1438, 2706, 3150, 4769, <u>5465</u> , 5773, 7028, 8281–		
	8289, 8860, <u>9123</u> , <u>9254</u> , <u>10238</u> , 11719, 14766, B4a	B4a1cla1	<u>15292</u> , 15323, 15326, <u>16182</u> , <u>16183</u> , <u>16189</u> , <u>16217</u> , <u>16261</u> , <u>16519</u>		

	<u>73</u> , 75, <u>89</u> , 263, 523–524, <u>709</u> , 750, 1438, 2706, 3150, 4769, <u>5465</u> , 7028, 8281–8289,		
142	8860, <u>9123</u> , <u>9254</u> , <u>10238</u> , 11719, 14766, B4a <u>15292</u> , 15326, <u>16182</u> , <u>16183</u> , <u>16189</u> , <u>16217</u> , <u>16261</u> , 16519	B4a	B4alclal
	<u>73</u> , <u>146</u> , <u>150</u> , <u>195</u> , <u>263</u> , 750, 1119, 1438, 2706, 3150, 3169, 3497, 4769, 5441, 7028, 8281–		
143	8289, 8860, 10310, 10398, 11719, 13629, B4c1c 14766, 15326, 15346, 15941, <u>16182</u> , <u>16183</u> , <u>16189</u> , <u>16217</u> , <u>16295</u>	B4c1c	B4c1c
	<u>73</u> , <u>146</u> , <u>150</u> , <u>195</u> , <u>263</u> , 750, 1119, 1438, 2706, 3150, 3169, 3497, 4769, 5441, 7028, 8281–		
144	8289, 8860, 10310, 10398, 11719, 13629, B4c1c 14766, 15326, 15346, 15941, <u>16182</u> , <u>16183</u> , <u>16189</u> , <u>16217</u> , <u>16295</u>	B4c1c	B4c1c
	<u>73</u> , <u>146</u> , <u>150</u> , <u>195</u> , <u>263</u> , 750, 1119, 1438, 2706, 3150, 3169, 3497, 4769, 5441, 7028, 8281–		
145	8289, 8860, 10310, 10398, 11719, 13629, B4c1c 14766, 15326, 15346, 15941, <u>16182</u> , <u>16183</u> , <u>16189</u> , <u>16217</u> , <u>16295</u>	B4c1c	B4c1c
	<u>73</u> , <u>146</u> , <u>150</u> , <u>195</u> , <u>263</u> , 750, 1119, 1438, 2706, 3150, 3169, 3497, 4769, 5441, 7028, 8281–		
146	8289, 8860, 10310, 10398, 11719, 13629, B4c1c 14766, 15326, 15346, 15941, <u>16182</u> , <u>16183</u> , <u>16189</u> , <u>16217</u> , <u>16295</u>	B4c1c	B4c1c
	<u>73</u> , <u>150</u> , <u>263</u> , 750, 955, 961, 1438, 2706, 4769, 5231, 5417, 7028, 8860, 11719, 12358, 12372,		
147	12705, 14766, 15067, 15326, <u>16172</u> , <u>16223</u> , <u>16257</u> , <u>16261</u> , <u>16497</u>	N9a2a	N9a2a
	<u>73</u> , <u>150</u> , <u>263</u> , <u>513</u> , <u>514</u> , 750, 955, 961, 1438, 2706, 3083, 4769, 5231, 5417, 7028, 8860,		
148	11719, 12358, 12372, 12705, 14766, 15067, N9a2a 15326, <u>16172</u> , <u>16223</u> , <u>16257</u> , <u>16261</u> , <u>16311</u> , <u>16497</u>	N9a2a	N9a2a

149	<u>73, 150, 263, 750, 955, 961, 1438, 2706, 4769,</u> 5231, 5417, 7028, 8860, 11719, 12358, 12372, 12705, 14766, 15067, 15326, <u>16172, 16223,</u> <u>16257, 16261, 16497</u>	N9a2a	N9a2a
150	<u>73, 150, 263, 750, 955, 961, 1438, 2706, 4769,</u> 5231, 5417, 5442, 7028, 8860, 9022, 11719, 12358, 12372, 12705, 14766, 15067, 15326, <u>16172, 16223, 16257, 16261, 16497</u>	N9a2a	N9a2a
151	<u>73, 150, 263, 750, 955, 961, 1438, 2706, 4769,</u> 5231, 5417, 7028, 8860, 9058, 11719, 12358, 12372, 12705, 14766, 15067, 15326, <u>16172,</u> <u>16223, 16257, 16261, 16335, 16497</u>	N9a2a	N9a2a
152	<u>73, 150, 263, 750, 955, 961, 1438, 2706, 4769,</u> 5231, 5417, 7028, 8860, 10506, 11719, 12358, 12372, 12624, 12705, 14766, 15067, 15326, <u>16172, 16223, 16257, 16261, 16497</u>	N9a2a	N9a2a
153	<u>73, 150, 263, 750, 955, 961, 1438, 2706, 4769,</u> 5231, 5417, 7028, 8860, 11719, 12358, 12372, 12705, 12879, 14766, 15067, 15326, <u>16172,</u> <u>16223, 16257, 16261, 16292, 16311, 16497</u>	N9a2a	N9a2a
154	<u>73, 150, 263, 750, 955, 961, 1438, 2706, 2831,</u> 3866, 4769, 5231, 5417, 7028, 8860, 11719, 12358, 12372, 12705, 14569, 14766, 15067, N9a2a 15326, <u>16093, 16172, 16223, 16257, 16261,</u> <u>16497</u>	N9a2a	N9a2a
155	<u>73, 150, 263, 750, 955, 961, 1438, 2706, 2831,</u> 3866, 4769, 5231, 5417, 7028, 8860, 11719, 12358, 12372, 12705, 14569, 14766, 15067, N9a2a 15326, <u>16093, 16172, 16223, 16257, 16261,</u> <u>16497</u>	N9a2a	N9a2a
156	<u>73, 150, 263, 750, 955, 961, 1438, 2706, 3866,</u> 4769, 5231, 5417, 7028, 8860, 11719, 12358, 12372, 12705, 14766, 15067, 15326, <u>16093,</u> <u>16172, 16223, 16257, 16261, 16497</u>	N9a2a	N9a2a

157	<u>73, 150, 263, 750, 955, 961, 1438, 2706, 4769,</u> 5231, 5417, 7028, 8860, 11719, 12358, 12372, 12705, <u>14148</u> , 14766, 15067, 15326, <u>16172</u> , <u>16223, 16257, 16261, 16497</u>	N9a2a	N9a2a2
158	<u>73, 263, 489, 523–524, 750, 1382, 1438, 2706,</u> 3010, 4769, 4883, 5178, 7028, 8020, <u>8251</u> , 8414, 8701, 8860, 8964, 9540, 9824, <u>10104</u> , 10398, 10400, 10873, 11719, 12705, 14301, 14668, 14766, 14783, 15043, 15301, 15326, <u>15524, 16223, 16362</u>	M9:G:D	D4b2a2
159	<u>73, 263, 455, 489, 523–524, 750, 1438, 2706,</u> 3010, 4769, 4883, 5178, <u>5539</u> , <u>6503</u> , 7028, 8414, 8701, 8860, 8981, 9540, <u>9938</u> , 10398, 10400, 10873, 11719, 11959, <u>12085</u> , 12705, <u>13879</u> , 14668, 14766, 14783, 15043, 15301, <u>15326, 16223, 16362, 16519</u>	M9:G:D	D4d
160	<u>73, 204, 263, 489, 523–524, 750, 1438, 2706,</u> 3010, 4769, 4883, 5178, <u>5539</u> , <u>6503</u> , 6524, 7028, 8414, 8701, 8860, 9540, <u>9938</u> , 10398, 10400, 10873, 11719, <u>12085</u> , 12705, <u>13879</u> , 14259, 14668, 14766, 14783, 15043, 15301, <u>15326, 16223, 16362, 16519</u>	M9:G:D	D4d
161	<u>73, 263, 489, 523–524, 750, 1438, 2706, 3010,</u> 4769, 4883, 5178, <u>5539</u> , <u>6503</u> , 7028, 8414, 8701, 8860, 9540, <u>9938</u> , 10398, 10400, 10873, 11719, <u>12085</u> , 12705, <u>13879</u> , 14668, 14766, 14783, 15043, 15301, 15326, <u>16223, 16362,</u> <u>16519</u>	M9:G:D	D4d
162	<u>73, 204, 263, 489, 523–524, 750, 1438, 2706,</u> 3010, 4769, 4883, 5178, <u>5539</u> , <u>6503</u> , 6524, 7028, 8414, 8701, 8860, 9540, <u>9938</u> , 10398, 10400, 10873, 11719, <u>12085</u> , 12705, <u>13879</u> , 14668, 14766, 14783, 15043, 15301, 15326, <u>16223, 16362, 16519</u>	M9:G:D	D4d

	<u>73, 263, 489</u> , 750, 1438, 2706, 3010, 4769, 4883, 5178, 6305, 7028, 8414, 8701, 8860,	
163	9540, 10398, 10400, 10873, 11215, 11719, M9;G:D D4e2 12705, 14668, 14766, 14783, 15043, 15301, 15326, <u>15874</u> , <u>16223</u> , <u>16362</u>	
	<u>73, 263, 489</u> , 750, 1438, 2706, 3010, 4769, 4883, 5178, 7028, 8414, 8701, 8860, 9053,	
164	9540, 10398, 10400, 10873, 11215, 11719, M9;G:D D4e2 12705, 14668, 14766, 14783, 15043, 15301, 15326, <u>15874</u> , <u>16223</u> , <u>16362</u>	
	<u>73, 263, 489</u> , <u>573</u> , 750, 1438, 1462, 2706, 3010, 4769, 4883, 5178, 7028, 8414, 8701, 8860, 8945, 9540, 10398, 10400, 10873,	M9;G:D D4e2a
165	11215, 11719, 12705, <u>13716</u> , 14668, 14766, 14783, 15043, 15301, 15326, <u>15874</u> , <u>16223</u> , <u>16362</u> , <u>16519</u>	
	<u>73, 263, 489</u> , <u>573</u> , 750, 1438, 2706, 3010, 4769, 4883, 5178, 6755, 7028, 8414, 8701, 8860, 8945, 9540, 10398, 10400, 10873,	M9;G:D D4e2a
166	11215, 11719, 12705, <u>13716</u> , 14668, 14766, 14783, 15043, 15301, 15326, <u>15874</u> , <u>16223</u> , <u>16362</u>	
	<u>73, 263, 489</u> , 750, 1438, 3010, <u>4538</u> , 4769, 4883, 5178, 5237, 6755, 7028, <u>7270</u> , 8414,	
167	8701, <u>8764</u> , 8860, 9540, 10398, 10400, 10873, M9;G:D D4f1 <u>11255</u> , 11719, 12705, 14668, 14766, 14783, 15043, 15301, 15326, <u>16223</u> , <u>16362</u> , <u>16519</u>	
	<u>73, 263, 489</u> , 750, 1438, 3010, <u>4538</u> , 4769, 4883, 5178, 6755, 7028, <u>7270</u> , 8414, 8701,	
168	<u>8764</u> , 8860, 9540, 10398, 10400, 10873, M9;G:D D4f1 <u>11255</u> , 11719, 12705, 14668, 14766, 14783, 15043, 15301, 15326, <u>16223</u> , <u>16362</u> , <u>16519</u>	

169	<u>73, 263, 489</u> , 750, 1438, 2706, 3010, 4769, 4883, 5178, 6755, 7028, 8414, 8701, 8860, 9540, 10398, 10400, 10873, 11696 , 11719, M9:G:D D4j 12705, 14325, 14668, 14766, 14783, 15043, 15301, 15326, <u>16223, 16293, 16362</u>	
170	<u>73, 263, 489</u> , 750, 1438, 2706, 3010, 3116, 3834, 4769, 4883, 5178, 6755, 7028, 8414, 8701, 8860, 9266, 9540, 10398, 10400, 10873, M9:G:D D4j 11696 , 11719, 12014, 12705, 14668, 14766, 14783, 15043, 15301, 15326, <u>16223, 16362</u>	
171	<u>73, 146, 263, 489</u> , 603, 750, 1438, 2706, 3010, 4769, 4883, 5178, 6509, 6755, 7028, 8414, 8701, 8860, 9540, 10398, 10400, 10873, M9:G:D D4j 11696 , 11719, 12705, 14668, 14766, 14783, 15043, 15301, 15326, 15670, <u>16223, 16293,</u> <u>16362</u>	
172	<u>73, 146, 263, 489</u> , 750, 1438, 2706, 3010, 4769, 4883, 5178, 6755, 7028, 8414, 8701, 8860, 9540, 10398, 10400, 10873, 11696 , M9:G:D D4j 11719, 12705, 14668, 14766, 14783, 15043, 15301, 15326, <u>16223, 16293, 16362</u>	
173	<u>73, 146, 263, 489</u> , 750, 1438, 1664, 2706, 3010, 4769, 4883, 5178, 6755, 7028, 8414, 8701, 8860, 9540, 10398, 10400, 10873, M9:G:D D4j 11696 , 11719, 12705, 14668, 14766, 14783, 15043, 15301, 15326, <u>16223, 16293, 16362</u>	
174	<u>73, 143, 146, 263, 489</u> , 750, 1438, 3010, 4538 , 4769, 4883, 5178, 6755, 7028, 7270 , 8414, 8701, 8764 , 8860, 9540, 10398, 10400, 10873, M9:G:D D4f1 11255 , 11279, 11719, 12705, 14668, 14766, 14783, 15043, 15301, 15326, <u>16223, 16362,</u> <u>16519</u>	
175	<u>73, 146, 152, 263</u> , 750, 1438, 2706, 3834, 4769, 5288, 5417, 6471, 7028, 8392, 8860, 10370, 10398, 11719, 12705, 13194, 14178, Y1 Y1 14693, 14766, 15326, 15883, <u>16126, 16176,</u>	

	<u>16231, 16318, 16399, 16519</u>		
176	<u>73, 146, 152, 263</u> , 709, 750, 1438, 2706, 3834, 4562, 4769, 5417, 7028, 8392, 8860, 10379, 10398, 11719, 12192, 12425, 12501, 12705, Y1 14178, 14693, 14766, 15326, <u>16126, 16231,</u> <u>16266, 16311, 16319, 16399, 16519</u>	Y1	
177	<u>73, 146, 263</u> , 709, 750, 1438, 2706, 3834, 4562, 4769, 5417, 7028, 8392, 8860, 10379, 10398, 11719, 12425, 12705, 14178, 14693, Y1 14766, 15326, <u>16126, 16231, 16266, 16319,</u> <u>16399, 16519</u>	Y1	
178	<u>73, 146, 263</u> , 709, 750, 1438, 2706, 3834, 4562, 4769, 5417, 7028, 8392, 8860, 10379, 10398, 11719, 12425, 12705, 14178, 14693, Y1 14766, 15326, <u>16126, 16231, 16266, 16319,</u> <u>16399, 16519</u>	Y1	
179	<u>73, 146, 152, 263</u> , 709, 750, 1438, 2706, 3834, 4562, 4769, 5417, 7028, 8392, 8860, 10379, 10398, 11719, 12192, 12501, 12705, 14178, Y1 14693, 14766, 15326, <u>16126, 16231, 16266,</u> <u>16311, 16319, 16399, 16519</u>	Y1	
180	<u>73, 146, 263</u> , 709, 750, 1438, 2706, 3834, 4562, 4769, 5417, 7028, 8392, 8860, 10379, 10398, 11719, 11965, 12192, 12501, 12705, Y1 14178, 14693, 14766, 15326, <u>16126, 16231,</u> <u>16266, 16311, 16319, 16354, 16399, 16519</u>	Y1	
181	<u>73, 146, 263</u> , 709, 750, 1438, 2706, 3834, 4562, 4769, 5417, 7028, 8392, 8860, 10379, 10398, 11719, 12192, 12501, 12705, 14178, Y1 14693, 14766, 15326, <u>16126, 16231, 16266,</u> <u>16319, 16399, 16519</u>	Y1	
182	<u>73, 146, 263</u> , 709, 750, 1438, 2706, 3834, 4562, 4769, 5417, 7028, 8392, 8860, 8928, 10379, 10398, 11719, 11965, 12192, 12501, Y1 12705, 14178, 14693, 14766, 15326, <u>16126,</u> <u>16231, 16266, 16311, 16319, 16399, 16519</u>	Y1	

183	<u>73, 146, 263</u> , 709, 750, 1438, 2706, 3834, 4562, 4769, 5417, 7028, 8392, 8860, 10379, 10398, 11719, 12192, 12501, 12705, 14178, Y1 14693, 14766, 15261, 15326, <u>16126, 16231</u> , <u>16266, 16287, 16319, 16399, 16519</u>	Y1
184	<u>73, 146, 195, 245, 263</u> , 750, 1438, 2706, 3834, 4769, 5417, 5628, 7028, <u>7933</u> , 8392, 8603, 8860, 10398, 11719, 11935, 12192, 12501, Y1 12705, 14178, 14410, 14693, 14766, 15326, <u>16126, 16193, 16231, 16266, 16519</u>	Y1a
185	<u>73, 146, 207, 263</u> , 750, 1438, 2706, 3834, 4769, 5417, 7028, 8392, 8860, <u>10097</u> , 10398, 11719, 12192, 12501, 12705, 13512, 14178, Y1 14693, 14766, <u>15221</u> , 15326, <u>15460</u> , <u>16126</u> , <u>16231, 16266, 16519</u>	Y1b1
186	<u>73, 146, 263</u> , 750, 1438, 2706, 3834, 4205, 4769, 5417, 7028, 8392, 8860, <u>9278</u> , <u>10097</u> , 10398, 11719, 12192, 12501, 12662, 12705, Y1 13512, 14178, 14693, 14766, <u>15221</u> , 15326, <u>15460</u> , <u>16126, 16231, 16266, 16519</u>	Y1b1a